

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Emanuele Guimarães Silva

**DISSECANDO ASPECTOS DA RESPOSTA ANTIVIRAL UTILIZANDO O MODELO
DA MOSCA DROSOPHILA MELANOGASTER**



Belo Horizonte
2014

Emanuele Guimarães Silva

**DISSECANDO ASPECTOS DA RESPOSTA ANTIVIRAL UTILIZANDO O MODELO
DA MOSCA DROSOPHILA MELANOGASTER**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. João Trindade Marques

Coorientador: Dr. Sérgio Costa

Belo Horizonte
Abril de 2014

043

Silva, Emanuele Guimarães.

Dissecando aspectos da resposta antiviral utilizando o modelo da mosca *Drosophila melanogaster* [manuscrito] / Emanuele Guimarães Silva. – 2014. 83 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. João Trindade Marques. Co-orientador: Dr. Sérgio Costa. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Antivirais. 4. Imunidade. 5. Arbovirus. I. Marques, João Trindade. II. Oliveira, Sérgio Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE EMANUELE GUIMARÃES SILVA. Aos vinte e cinco dias do mês de abril de 2014 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Dissecando aspectos da resposta antiviral utilizando o modelo da mosca *Drosophila melanogaster*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. João Trindade Marques, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Sérgio Costa Oliveira-co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. João Trindade Marques - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de abril de 2014.

Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn (UFMG)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dr. Sérgio Costa Oliveira-co-orientador (UFMG)

Dr. João Trindade Marques - Orientador (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. João Trindade Marques, mais do que pela excelente orientação que me permitiu evoluir cada dia mais, agradeço o apoio e compreensão durante todo o mestrado. Isso foi fundamental para o progresso de nosso trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de RNA de Interferência que SEMPRE estiveram disponíveis em me ajudar. Em especial ao Roenick, Isaque e Kátia H. por me ajudarem em muitos experimentos, compreensão de resultados e técnicas. Ao André e Karlinha por me ensinarem a formatar arquivos.

À Professora Dra. Erna Kroon por ter aberto as portas do Laboratório de Vírus e aos colegas de lá. Ana Moreira, Kátia Paulino e João Rodrigues, obrigada por todos os ensinamentos iniciais tanto da parte de bancada quanto teóricos.

Ao Professor Dr. Sérgio Costa e aos colegas do Laboratório de Imunobiologia de doenças infecciosas, especialmente ao colega Guilherme Martins pelo aprendizado de algumas técnicas.

Aos membros do Laboratório de Neurobioquímica, especialmente à Professora Fabíola Mara Ribeiro.

À Celise e Orlando da secretaria do Departamento de Bioquímica de Imunologia.

Às agências fomentadoras CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPq/UFMG.

À minha família: irmãos e tios, pelo apoio e incentivo. Especialmente aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu sempre continuasse estudando e evoluindo profissionalmente. Vocês são minha base; obrigada por sempre me apoiarem em minhas decisões. Exemplos da minha vida.

Ao Hugo pelo companheirismo, ajuda e paciência e aos seus pais pelas inúmeras vezes que foram solidários comigo durante estes dois anos de mestrado.

Aos amigos de Biomedicina e de Itaúna, especialmente ao Philipe e à Brunna, pela eterna amizade.

Ao Lucas, pelo seu sorriso ao acordar todas as manhãs.

À, Deus que nunca me deixou cair.

RESUMO

As doenças causadas por arbovírus, como a Dengue, causam grande impacto na saúde pública em todo o mundo. Os arbovírus são transmitidos por vetores invertebrados aos seus hospedeiros e, para isto, devem interagir com o sistema imune do vetor para serem capazes de ser transmitidos. Desta forma, o entendimento das vias de imunidade antiviral nos insetos poderia ajudar na criação de estratégias para o controle da transmissão dos arbovírus. A imunidade contra os vírus em insetos é mediada principalmente pela via de RNA de interferência (RNAi), ativada pelo reconhecimento de uma dupla fita de RNA (dsRNA) originária de intermediários da replicação viral. Este reconhecimento leva a produção de pequenos RNAs interferentes (siRNAs) que se associam a proteínas da família Argonata para formar o complexo de silenciamento que promove a degradação de transcritos virais. Outras vias de imunidade em insetos, como JaK-STAT, Toll e Imd, também podem estar envolvidas na resposta antiviral. Um fato importante, é que durante epidemias, o inseto vetor poderia ser exposto a infecção múltiplas pelo mesmo vírus. Devemos considerar ainda que naturalmente os insetos podem carregar uma ou mais infecções por vírus diferentes ao longo de suas vidas. Assim, o nosso objetivo principal neste trabalho foi caracterizar o efeito de co-infecções sobre a interação entre arbovírus e inseto vetor. Nós investigamos se a exposição prévia a um determinado vírus teria impacto sobre uma segunda infecção pelo mesmo patógeno ou outro não relacionado. Como modelo de estudo, nós utilizamos a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* infectada com o arbovírus *vesicular stomatitis virus* (VSV). Para diferenciar os vírus utilizados na primeira e segunda infecção, nós utilizamos, no contato secundário, um vírus capaz de expressar GFP como gene repórter. Neste modelo, nós observamos a existência de um mecanismo de interferência da primeira infecção sobre a capacidade de replicação do segundo vírus. Este efeito observado é dependente da dose viral e do tempo de infecção sugerindo que este mecanismo seja saturável. A interferência foi observada também em moscas mutantes para Dicer-2 e R2D2, deficientes para a via de RNAi, indicando que a principal via antiviral de insetos não está envolvida neste fenômeno. Nós também observamos que a interferência sobre o segundo vírus não é específica, pois o mesmo fenômeno é observado com um vírus heterólogo, neste caso, o SINV (*Sindbis virus*). Este resultado está de acordo com a independência da via de RNAi, já que os siRNAs antivirais seriam específicos para cada vírus. Para analisar se vias de sinalização como Jak-STAT ativadas em resposta à infecção viral estariam envolvidas no fenômeno de interferência, nós medimos a expressão de genes marcadores nos diversos grupos de moscas infectadas. Não houve diferença significativa na expressão de genes marcadores após a segunda infecção em moscas controle ou pré-infectadas. Embora preliminar este resultado sugere que a indução deste grupo de genes também não explicaria a interferência com a segunda infecção. Nosso trabalho teve um enfoque no possível mecanismo de interferência mediado pela resposta do hospedeiro; no entanto, é possível também que haja interferência direta por competição do primeiro vírus sobre o segundo.

Palavras chaves: *Drosophila melanogaster*, imunidade antiviral, arbovírus.

ABSTRACT

The diseases caused by arboviruses, such as dengue, have a great impact on global public health. Arboviruses are transmitted to vertebrate hosts by invertebrate vectors where they must interact with the immune system. Thus, understanding insect antiviral immune pathways could help the design of strategies to control arbovirus transmission. Immunity against viruses in insects is mainly mediated by RNA interference (RNAi) pathway which is activated by recognition of double-stranded RNA (dsRNA) originating from intermediates of viral replication. This recognition leads to the production of small interfering RNAs (siRNAs) that associate with Argonaute family proteins to form a complex that promotes the degradation of viral transcripts. Other insect immune pathways, such as JAK-STAT, Toll and IMD may also be involved in the antiviral response. During outbreaks, the insect vector could be exposed to multiple infections by the same virus. We should also consider that insects can naturally carry one or more different viruses infections. Thus, our main objective in this work was to characterized the effect of co-infections on the interaction between arbovirus and the insect vector. We investigated whether prior exposure to a virus could have an impact on a secondary infection. As a model of infection, we used the fruit fly *Drosophila melanogaster* infected with the arbovirus *Vesicular stomatitis virus* (VSV). To differentiate the virus used in the first and in the second infection, we used a virus capable of expressing GFP as a reporter. In this model, we observed interference on the replication of the second virus by the first infection. This effect is dependent of the dose and the time of viral infection suggesting that it is mediated by a saturable mechanism. The interference was also observed in RNAi defective flies indicating that the main antiviral pathway of insects is not involved in this phenomenon. We also observed that the interference is not virus-specific, because the same phenomenon is observed when a heterologous virus, SINV (*Sindibis virus*), was used. This result is in accordance with the independence of the RNAi pathway, since the antiviral siRNAs would be specific for each virus. We also measured the expression of marker genes in different groups of infected flies in order to examine whether signaling pathways such Jak-STAT would be differentially activated. However, there was no significant difference in the expression of marker genes after the second infection in pre-infected or control flies. Although preliminary, this result suggests that the inductin of virus-responsive genes does not explain the interference. Our work has mostly focused on possible mechanisms of interference mediated by the host response. However, it is also possible that there may be direct interference of the first virus on the replication of the second. Further work using mutant flies in other immune pathways as well as other pathogens will be needed to define the mechanism of interference described here.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, antiviral immunity, arbovirus.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de sinalização do sistema imune inato de <i>Drosophila Melanogaster</i>	17
Figura 2 - Via de siRNA em <i>Drosophila Melanogaster</i>	23
Figura 3 - Representação esquemática das infecções duplas em moscas adultas	35
Figura 4 -Efeito citopático causado pelo VSV e SINV em células VERO	40
Figura 5 - Expressão da proteína GFP em células infectadas com SINV-G e VSV-G.	41
Figura 6- Cinética de replicação viral após a injeção de diferentes doses do VSV e VSV-GFP em moscas adultas	43
Figura 7 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a injeção em moscas adultas nos experimentos 1 e 2	44
Figura 8 - Efeito da exposição prévia com VSV em moscas infectadas com VSV-GFP	45
Figura 9 - Representação esquemática dos tempos de infecção e dose do VSV para a injeção em moscas adultas do experimento 3.....	46
Figura 10 - Efeito da exposição prévia ao VSV em moscas selvagens após o aumento da dose do segundo vírus	46
Figura 11 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a injeção em moscas adultas do experimento 4.....	47
Figura 12 - Efeito da exposição prévia ao VSV em moscas selvagens após o aumento do tempo da segunda infecção	48
Figura 13 - Titulação de moscas selvagens infectadas com VSV e VSV-GFP	50
Figura 14 - Dosagem da expressão dos genes TotM e CG11501 em moscas infectadas com VSV e VSV-GFP	51
Figura 15 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a ainjeção em moscas mutantes para a via de RNAi	54
Figura 16 - Efeito da exposição prévia ao VSV na segunda infecção com VSV-GFP em moscas mutantes para a via de RNAi	55
Figura 17 - Porcentagem de moscas mutantes para a via de siRNA infectdas com VSV e VSV-G que expressram GFP	56

Figura 18 - Dosagem da expressão dos genes TotM e CG501 em moscas muatantes para Dcr-2 e R2D2 infectadas com VSV e VSV-GFP	57
Figura 19 - Cinética de replicação viral após a injeção de diferentes doses do SINV em moscas adultas	59
Figura 20 - Representação esquemática dos tempos de infecção e dose do VSV e SINV para a injeção em moscas adultas do experimento 6	60
Figura 21 - Efeito da infecção prévia com VSV em moscas selvagens infectadas com SINV	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Iniciadores utilizados para qPCR	38
Tabela 2 - Título do VSV em células VERO pelos ensaios de PFU/mL e TCID50/mL	39
Tabela 3 - Título do VSV em células VERO pelo método de PFU	40
Tabela 4 - Título do SINV-G antes e após a sua concentração	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - *Antimicrobial Peptides*

AGO2 - *Argonauta-2*

Arbovirus - *arthropod-borne viruses*

ATCC - *American Type Culture Collection*

cDNA - *DNA complementar*

CMC - *carboximetilcelulose*

CrPV - *Cricket Paralysis virus*

Dcr2 – *Dicer-2*

DCV - *drosophila C virus*

DEN-2 - *Dengue virus 2*

Dome - *Domeless*

dsRNA – *double strand RNA*

DXV - *Drosophila X virus*

Endo-siRNAs – *siRNAs endógenos*

Exo-siRNAs – *siRNAs exógenos*

FHV - *Flock House virus*

Hop – *Hopscotch*

IKK - *IκB Kinase*

Imd - *immune deficiency*

Jak-STAT - *Janus family kinase - signal transducer and activator of transcription*

MAPKKK - *Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Kinase Kinase*

miRNA – *microRNAs*

mRNA - RNA mensageiro

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

ncRNAs - *non-coding RNA*

NF- κ B - *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*

PEG - *polyethylene glycol*

piRNAs - *piwi-interacting RNAs*

PFU - Unidade Formadora de Placa

PGRL-LE - *Gram-negative bacteria peptidoglycan recognition proteins-LE*

piRNAs - *Piwi-associated RNAs*

PVX - *Potato virus x*

qPCR - *quantitative PCR*

R2D2 - proteína ligante de dsRNA R2D2

RISC - *RNA-induced silencing complex*

RLRs - *RIG-I-like receptors*

RNAi – *Interference RNA*

RpL32 - *Ribosomal particle L32*

RPM - Rotações por Minuto

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida de PCR quantitativo

SFB - soro fetal bovino

siRNAs- *small interfering RNA*

SINV - *Sindibis virus*

SINV-G - SINV-GFP

Spz - *Spaetzle*

TCID50 - diluição viral requerida para infectar 50% das células inoculadas

TLR7 - *Toll-like Receptor 7*

TLRs - *Toll-like-receptors*

Tot A – *Turandot A*

Tot M – *Turandot M*

VSV - *Vesicular Stomatitis vírus*

VSV-G – VSV-GFP

Upd - *unpaired*

Vir-1 - *virus-induced RNA 1*

viRNAs - *virus-derived small interfering RNAs*

VSR - *viral supressor of RNAi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Arbovírus.....	15
1.2 Imunidade inata em insetos	16
1.2.1 A via de RNA de Interferência em insetos	19
1.2.3 Características das respostas antivirais em insetos	24
1.3 Modelos de estudo.....	27
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Cultivo da linhagem celular	30
4.2 Preparação dos estoques virais.....	30
4.3 Concentração do SINV-G.....	31
4.4 Titulação dos vírus por contagem de unidade formadora de placa (PFU)	31
4.5 Titulação do VSV pelo método TCID50	32
4.6 Estoque e manutenção das moscas	32
4.7 Microinjeção em moscas adultas	33
4.8 Cinética de infecção viral <i>in vivo</i>	33
4.9 Infecções com VSV e VSV-G/SINV-G em moscas adultas.....	34
4.10 Titulação das moscas infectadas com VSV e VSV-GFP.....	35
4.11 Extração do RNA total de moscas infectadas	36
4.12 Transcrição reversa	36
4.13 PCR quantitativo (qPCR)	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Crescimento dos estoques virais	39
5.2 Cinética de replicação viral e dose resposta do VSV	42
5.3 Infecções com VSV e VSV-GFP em moscas selvagens.....	43
5.4 Infecções com VSV e VSV-GFP em moscas mutantes para via de siRNA.....	53
5.5 Cinética de replicação viral e dose resposta do SINV.....	59
5.6 Infecção em moscas selvagens com VSV e SINV	60

6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÕES	66
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Os arbovírus constituem um grupo de vírus de RNA que são transmitidos a hospedeiros vertebrados por vetores artrópodes, em sua maioria, insetos. (Avadhanula et al., 2009). Muitos destes vírus infectam humanos e animais levando à patologia e podendo ocasionar a morte. Dados epidemiológicos revelam o grande número de doenças transmitidas por estes vírus em diferentes partes do mundo que podem se restringir a regiões geográficas específicas dependendo da espécie viral. É o caso do *Dengue virus* que acomete as áreas tropicais e subtropicais do globo e o *West Nile virus*, que assim como o *Dengue virus*, levou a um grande número de doenças e mortes no norte e sul da América há alguns anos (Charrel et al., 2007; March et al., 2006). Estes vírus pertencem ao gênero flavivirus e ocasionam os exemplos mais importantes de doenças emergentes do mundo. Desta forma, a investigação acerca dos arbovírus torna-se extremamente relevante, uma vez que eles representam um grande risco para a saúde pública mundial (Gubler, 1998; Mackenzie et al., 2004).

Os arbovírus compreendem as seguintes famílias virais: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*. Os vírus destas famílias têm a capacidade de se replicarem eficientemente tanto nos vetores de invertebrados quanto nos hospedeiros vertebrados (Huang et al., 2013). Porém, em vertebrados, a infecção torna-se aguda, agindo de forma citolítica, ao passo que nos vetores de artrópodes, a mesma infecção é mantida por toda a vida do inseto e tornando-se persistente, fato que permite a transmissão eficiente do vírus (Avadhanula et al., 2009).

Para a maioria das arboviroses, não há um tratamento antiviral eficaz nem vacinas disponíveis (Avadhanula et al., 2009). Pouco se sabe sobre interação destes vírus com os seus vetores invertebrados e as respostas antivirais envolvidas no combate à infecção no inseto vetor. Os arbovírus devem interagir com o sistema imune do inseto vetor para serem capazes de ser transmitidos. Assim, o entendimento dos mecanismos antivirais presentes nas células de insetos pode ajudar na elaboração de estratégias que interfiram na interação vírus-vetor de forma a controlar a transmissão pelo inseto vetor.

1.2 Imunidade inata em insetos

Os insetos não apresentam imunidade adaptativa como em mamíferos e o sistema inato constitui o principal mecanismo de defesa contra microrganismos, ao detectar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated Molecular Patterns*). Muitos estudos sobre as vias de sinalização de imunidade em invertebrados foram realizados em *Drosophila melanogaster*, a mosca da fruta. Neste modelo foi possível caracterizar as vias de imunidade e observar mecanismos conservados em outros organismos. Um exemplo, são os TLRs em mamíferos, (do inglês, *toll-like-receptors*) que foram identificados primeiro em *Drosophila* e apresentam alta homologia aos receptores *Toll* presentes neste organismo.

Mediante a infecções microbianas em invertebrados, alguns mecanismos de imunidade são ativados como as vias de *Toll*, *Imd* (do inglês, *Immune deficiency*) e *Jak* (do inglês, *Janus family kinase*)-*STAT* (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*) (Agaisse & Perrimon, 2004; Ferrandon et al., 2007) (Figura 1). Bactérias gram-positivas e fungos geralmente ativam a via de *Toll* enquanto a via de *Imd* é ativada por bactérias gram-negativas (Hoffmann & Reichhart, 2002; Naitza & Ligoxygakis, 2004; Tanji & Ip, 2005). Estes mecanismos levam à produção de peptídeos antimicrobianos como drosomicina e dipetericina e a processos de fagocitose e melanização (Hoffmann & Reichhart, 2002). A via de *Jak-STAT*, de um modo geral, torna-se ativa pelo estresse celular que pode ocorrer durante infecções bacterianas e virais. Nesse caso, membros da família do gene *Turandot* podem ser expressos com a finalidade de reestabelecer a homeostase celular (Agaisse et al., 2003; Ekengren & Hultmark, 2001).

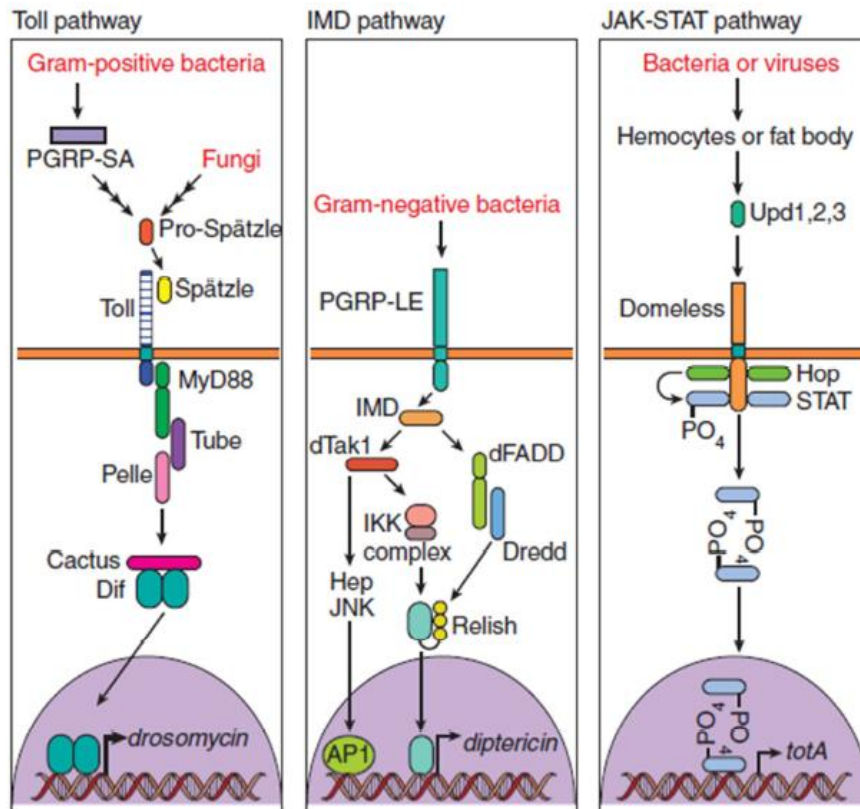


Figura 1 - Vias de sinalização do sistema imune inato de *Drosophila Melanogaster*. A via de *Toll* é ativada pela proteína Spaetzle (Spz) em resposta ao reconhecimento de moléculas derivadas de fungos e bactérias gram-positivas. A ligação de Spz ao receptor *Toll* promove o recrutamento das proteínas Myd88, Tube e Pelle; esta última promove a dissociação entre Cactus, um inibidor semelhante a I κ B e o fator de transcrição *Dif*. Então, *Dif* transloca para o núcleo onde ativa a transcrição de genes de AMPs, como a drosomicina. A ativação da via de *Imd* ocorre pelo reconhecimento de bactérias gram-negativas pelo receptor PGRP-LE (*Gram-negative bacteria peptidoglycan recognition proteins-LE*), o que leva ao recrutamento da molécula adaptadora IMD. Esta proteína promove a ativação dos complexos dFADDredd e MAPKKK *Drosophila* TAK1(dTak1). Ambos os complexos promovem a ativação de IKK-b e IKK-c que fosforilam o fator transcripcional *Relish*. O domínio de ligação ao DNA de *Relish* transloca para o núcleo, promovendo a transcrição de dipterocina. A via clássica de JAK-STAT em *drosophila* é iniciada pela ligação de citocinas da família Upd (do inglês, *unpaired*), ao receptor transmembrana *Domeless* (*Dome*), que apresenta homologia aos receptores de citocina-I em vertebrados. Esta ligação promove a fosforilação de Hop (do inglês, *Hopscotch*), um análogo de Jak em *drosophila*, que ativa o fator transcripcional STAT promovendo então, a transcrição de genes envolvidos no estresse celular, injúria séptica e resposta antiviral, como TotA. (Adaptado de: (Bier & Guichard, 2012)).

Em relação à defesa antiviral em insetos, as vias e as respostas contra vírus são menos conhecidas. Sabe-se que esta defesa é composta de mecanismos que envolvam o processo de autofagia e a cascata de fenoloxidase (Rodriguez-Andres et al., 2012). Mas a imunidade contra vírus em insetos é mediada em grande parte pela via de RNA de interferência (RNAi), que reconhece o RNA viral e bloqueia a sua replicação dentro da célula (Ding, 2010).

Além da via de RNAi, outros estudos sugerem a participação das vias de *Toll*, *Imd* e *Jak-STAT* na resposta a infecção por determinados tipos de vírus em *Drosophila melanogaster* (Agaisse & Perrimon, 2004; Costa, et al., 2009; Huang et al., 2013; Zambon et al., e Wu, 2005). Um trabalho realizado por Nakamoto e colaboradores mostrou que o receptor de membrana *Toll-7* interage com VSV (*Vesicular Stomatitis virus*) e induz ao processo de autofagia, um mecanismo de defesa antiviral em *Drosophila* (Nakamoto et al., 2012). Neste caso, foi proposto um papel essencialmente antiviral de *Toll-7*, uma vez que moscas deficientes para este receptor foram capazes de promover uma resposta composta por peptídeos antimicrobianos durante uma injúria séptica (Yagi, Nishida, & Ip, 2010).

Diferentemente do que ocorrem em mamíferos, geralmente os receptores *toll* em *Drosophila* não reconhecem diretamente os patógenos virais (Jin & Lee, 2008). Zambon e colaboradores propuseram que a infecção viral neste organismo geraria a lise de células infectadas liberando moléculas celulares e produtos virais que são reconhecidos pelas vias de *Toll* e *Imd* em outras células (Zambon et al., 2005). Neste trabalho, foi demonstrado que a infecção por DXV (*Drosophila X virus*) também ativou a via de *Toll* nos indivíduos infectados; moscas mutantes para *Dif*, um fator transcricional da via, se tornaram mais sensíveis à infecção por este vírus. A via também foi ativa durante a infecção por Dengue vírus em mosquitos *Aedes aegypti* (Xi, Ramirez, & Dimopoulos, 2008).

Assim como a via de *Toll*, a via de *Imd* também converge na produção de peptídeos antimicrobianos em *Drosophila*. Neste caso, o fator de transcrição *Relish* é ativado e induz a produção de Dipterina. Tanto *Relish* quanto *Dif* apresentam homologia ao fator transcricional NF- κ B em mamíferos (Sabin, Hanna, & Cherry, 2010). O papel antiviral desta via foi demonstrado em trabalhos utilizando moscas infectadas com SINV (*Sindibis virus*) e CrPV (*Cricket Paralysis virus*) (Avadhanula et al., 2009; Costa et al., 2009).

A via de JaK -STAT é um dos principais mecanismos de defesa antiviral em mamíferos uma vez que está envolvida na produção de interferon (Dupuis et al., 2003; Ho et al., 2005). Em *Drosophila*, a infecção por alguns tipos de vírus promove uma resposta transcricional mediada em grande parte por JaK-STAT (Dostert et al., 2005). Dostert e colaboradores (2005) demonstraram que moscas deficientes para *Hop* (*Hopscotch*), um análogo de Jak em *Drosophila* e infectadas com DCV (*drosophila C virus*), apresentaram uma expressiva redução da expressão de *vir-1* (do inglês, *virus-induced RNA 1*), uma molécula envolvida na resposta antiviral. *Turandot M* (*TotM*), um outro gene regulado pela via Jak-STAT (Agaisse & Perrimon, 2004; Boutros et al., 2002) apresentou sua expressão elevada em moscas infectadas com FHV (*Flock House virus*) (Dostert et al., 2005). Foi demonstrado também a participação da via Jak-STAT no controle da infecção por *Dengue virus* em mosquitos *Aedes aegypti* (Souza-Neto, Sim, & Dimopoulos, 2009). Neste estudo, houve a regulação dos genes DVFR1 e DVFR2 que apresentam propriedades antivirais, pela via. Para ambos os organismos, mamíferos e invertebrados, a atividade da via aparenta ser conservada como mecanismo imune antiviral (L. Wang & Ligoxygakis, 2006).

É importante elucidar ainda o papel antiviral de processos de autofagia presentes em *Drosophila*. A autofagia é uma via que converge na degradação de componentes celulares, incluindo patógenos que estejam infectando estas células (Deretic & Levine, 2009). Shelly e colaboradores observaram que o mecanismo de autofagia é ativado pela glicoproteína G de VSV em moscas infectadas, sendo a via essencial na defesa contra este vírus nas moscas infectadas (Shelly et al., 2009).

1.2.1 A via de RNA de Interferência em insetos

Em células eucariotas, um dos mecanismos de regulação gênica a nível pós-transcricional ocorre pela ação de pequenos RNAs não codificantes, como parte de uma via referida de RNA de interferência. Esta via foi observada pela primeira vez no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, ao serem introduzidas neste organismo fitas senso e antisenso de RNA exógeno que agiria sobre um RNA complementar (Fire et al., 1998). Desta forma, foi possível observar um processo de silenciamento gênico pela ação da dupla fita de RNA. Após sua identificação em nematódeos, este mecanismo foi descrito também em invertebrados (Kennerdell & Carthew, 1998),

plantas (Waterhouse et al., 1998), mamíferos (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000), e praticamente todos os eucariotos estudados.

Partindo da ideia de que RNA ou DNA exógeno seria capaz de ativar um processo de silenciamento gênico, a via de RNA de interferência pode ser definida como um sistema de reconhecimento de moléculas alteradas de ácidos nucleicos (Faria et al., 2013). Mas para a ativação de tal via, é necessário que haja um intermediário de dupla fita de RNA (dsRNA, do inglês *double stranded RNA*) que será processado por enzimas do tipo RNase III, gerando os pequenos RNAs não codificantes. Estes ncRNAs (do inglês, *non-coding RNAs*) se associam a proteínas da família Argonauta, formando um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que agirá sobre mRNAs com sequências de nucleotídeos complementares aos pequenos RNAs, clivando estas sequências (Ding & Voinnet, 2007).

Logo após a descrição da via de RNAi, sugerido pela detecção de pequenos RNAs antivirais presentes em plantas infectadas com PVX (do inglês *Potato virus X*) (Hamilton e Baulcombe, 1999), esta via foi identificada como um potente mecanismo de defesa antiviral. Em 2002, Li e colaboradores demonstraram pela primeira vez o papel antiviral da via em animais invertebrados, utilizando o modelo de *Drosophila melanogaster*. Neste trabalho, pequenos RNAs virais também foram identificados após a infecção pelo FHV em moscas e células S2 (Li et al., 2002).

Além da identificação dos pequenos RNAs (siRNAs, do inglês *small interfering RNA*), outras duas classes de RNAs não codificantes também foram descritas posteriormente em trabalhos utilizando o modelo de *Drosophila*: os microRNAs (miRNA) que estão relacionados a regulação da expressão de genes endógenos (Bartel, 2004) e os piRNAs (do inglês, *Piwi-associated RNAs*) envolvidos no controle de elementos móveis na linhagem germinativa (Brennecke et al., 2007). Os miRNAs têm origem de *hairpin* de RNAs nucleares e apresentam complexos diferentes de processamento dos siRNAs que se originam, em sua maior parte de uma dupla fita de RNA exógena (Carthew & Sontheimer, 2009). Os siRNAs e miRNAs constituem a maior classe de RNAs não codificantes presentes em células de plantas e animais (Carthew & Sontheimer, 2009).

Muitos processos de defesa antiviral são conservados em diferentes organismos eucariotos dos quais apresentam similaridade nos mecanismos de reconhecimento de moléculas exógenas de DNA ou RNA por enzimas e receptores

celulares. A presença de DNA ou RNA exógeno pode ativar a via de RNA de interferência em invertebrados e plantas e vias produtoras de interferon em animais vertebrados (Mueller et al., 2010). Mas a via de RNAi foi o mecanismo primordial de defesa contra vírus entre os organismos vertebrados (Yan e Chen, 2012). Recentemente, a atividade antiviral da via de RNAi foi também demonstrada em mamíferos embora, neste caso, sua importância parece esta restrita a células indiferenciadas (Maillard et al., 2013). Em invertebrados, a via de siRNA constitui o principal mecanismo de defesa antiviral, mas outras vias também compõem o sistema imune contra vírus, como citado anteriormente. Alguns estudos sugerem ainda a participação dos piRNAs na defesa antiviral em insetos (Morazzani et al., 2012; Vodovar et al., 2012).

A via de produção de pequenos RNAs foi extensivamente caracterizada em *Drosophila melanogaster* e posteriormente, o papel da via de foi elucidada em mosquitos *Aedes aegypti* infectados com *Dengue virus* e *Sindibis virus* (Cirimotich et al, 2009; Khoo et al, 2010; Myles et al, 2008). Em mosquitos *Anopheles gambiae* também foi observado a importância da produção de pequenos RNAs virais, no controle da infecção por *O'nyong nyong virus* (Keene et al., 2004). Outros trabalhos demonstraram ainda a existência de viRNAs (do inglês, *virus-derived small interfering RNAs*) em mosquitos *Culex* infectados com *Densovirus* (Ma et al., 2011). Assim, a via de siRNA não somente exerce um papel fundamental na defesa antiviral em *Drosophila*, como também em outros insetos.

Durante uma infecção viral em células de insetos o principal padrão molecular de reconhecimento pelo sistema imune destes organismos é um dsRNA originário do genoma de vírus de polaridade positiva, negativa ou de vírus de dupla fita de RNA. Mueller e colaboradores demonstraram que a infecção por VSV, um vírus de fita simples negativa, em células de *Drosophila*, não produz quantidades facilmente detectáveis de dsRNA. No entanto, o vírus foi capaz de ativar a via de RNAi em indicado pelo fato de que moscas deficientes para a via apresentaram aumento da susceptibilidade ao VSV. Análises de sequenciamento de bibliotecas de moscas infectadas com mesmo vírus revelaram ainda a cobertura dos viRNAs no genoma e no anti-genoma do VSV, evidenciando que os viRNAs se originam de uma dsRNA a partir de intermediários da replicação do vírus (Mueller et al., 2010).

No caso de vírus de DNA, estudos sugerem que a formação da dsRNA é originária de uma transcrição bidirecional do genoma viral (Bronkhorst et al., 2012); porém não é sabido se são as proteínas virais ou proteínas das células do hospedeiro responsáveis pela síntese da fita antisense necessária para a formação do dsRNA. O que se tem conhecimento é que as fábricas virais de ambos os tipos de genomas, de vírus de DNA ou de RNA, podem se localizar em compartimentos celulares distintos; assim o reconhecimento do dsRNA pela via de RNAi ocorreria também em diferentes locais da célula, como no núcleo ou no citoplasma (Faria et al., 2013).

A maquinaria da via de siRNA em células de invertebrados consiste na presença da enzima Dicer-2 (Dcr-2) associada à proteína R2D2, além do complexo central de silenciamento representado pela Argonauta-2 (AGO2). Dcr-2, uma endoRNase III, é responsável pelo reconhecimento e clivagem do dsRNA a pequenos RNAs de 21 nucleotídeos (Carthew & Sontheimer, 2009). Os siRNAs virais originários pela ação da Dcr-2 são introduzidos ao complexo de silenciamento referido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), dos quais se associam a AGO2 (Lee et al., 2004). O heterodímero Dcr-2 / R2D2 direciona qual das fitas do siRNA será incorporada ao RISC, onde R2D2 se encontra associada na extremidade mais termodinamicamente estável do duplex enquanto Dcr-2 se liga na extremidade menos estável do siRNA (van den Berg, Mols, & Han, 2008). Os siRNAs são liberados do heterodímero antes de entrarem no siRISC e então R2D2 é substituída por AGO2 que cliva a fita senso – a fita passageira - do siRNA na porção 5', resultando na separação das fitas do duplex (Rand et al., 2005; Sioud, 2010). A figura 2 descreve as etapas envolvidas na produção de siRNAs. Outras proteínas acessórias também são incorporadas ao RISC para a dissociação de Dcr-2 do complexo (Van den Berg et al., 2008). A fita antisense restante, chamada de fita guia, se associa a AGO2 e reconhece sequências complementares de ssRNA (do inglês, *single strand RNA*) virais, como mRNA, que serão clivados pela mesma proteína AGO2 (Matranga et al., 2005). É importante pontuar que a origem do dsRNA é um fator que determina quais tipos de pequenos RNAs não codificantes serão gerados e quais proteínas da família AGO eles se associarão (Faria et al., 2013). O percussor que ativa a via de siRNA contém maiores trechos de dsRNAs, diferentemente dos pequenos *hairpins* que ativam a via de miRNA (Marques et al., 2010).

Além dos vsiRNAs, outras duas classes de pequenos RNAs compõem vias de silenciamento: os endo-siRNAs e exo-siRNAs. Os endo-siRNAs são originários de transcritos celulares e estão relacionados ao silenciamento de alvos endógenos (Marques et al., 2010). Já os exo-siRNAs são gerados pela introdução um dsRNA exógena no interior da célula. Para distinguir a origem do dsRNA, proteínas acessórias, as dsRBPs (do inglês, *dsRNA-binding protein*), são recrutadas junto à Dcr-2 para o reconhecimento de seus substratos, como a R2D2 e *loquacious* (loqs) (Faria et al., 2013). Ambas as proteínas são importantes para a funcionalidade das vias de siRNA e miRNA. Apesar de loqs ser necessária para as vias endógenas e exógenas, não há envolvimento desta proteína na defesa antiviral em *Drosophila*.

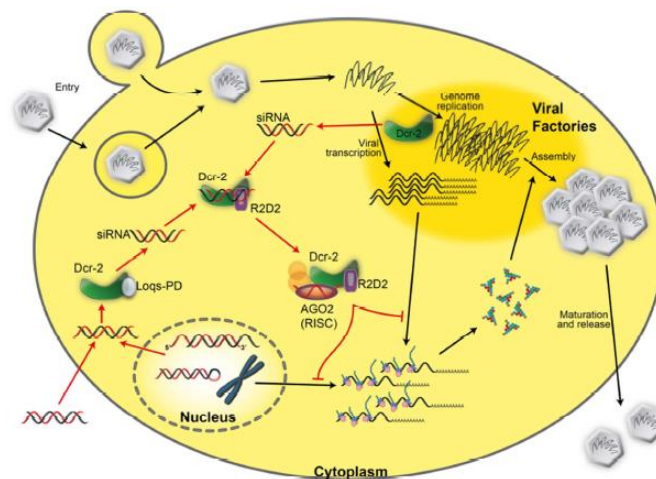


Figura 2 - Via de siRNA em *Drosophila Melanogaster*. Durante uma infecção viral em células de *Drosophila*, um dsRNA provindo de intermediários da replicação viral é reconhecido e clivado pela Dcr-2 a siRNAs de 21 nt. Dcr-2 associada a R2D2 se liga ao siRNA e o leva para AGO2 da qual cliva a fita passageira. AGO2, contendo a fita guia se direciona a sequências complementares de transcritos virais e cliva estes alvos. Os siRNAs também podem ser oriundos de genes endógenos, fazendo parte da via de endo-siRNA e de um dsRNA exógeno, introduzido na célula, sendo esta, a via de exo-siRNA. Um dsRNA originário de transcritos celulares endógenos ou de forma exógena não viral requer a atividade de Loqs-PD junto a Dcr-2. (Adaptado de OLMO et al., dados não publicados).

Como mencionado anteriormente, um dsRNA originário de um vírus de RNA ou de DNA e até mesmo de transcritos celulares endógenos, além de um dsRNA exógeno podem ativar a via siRNA através do reconhecimento pela Dcr-2. Porém não é sabido ao certo como ocorre os mecanismos de recrutamento e processamento por esta enzima, uma vez que estes substratos se encontram em diferentes compartimentos celulares. Sendo assim, estas enzimas podem se localizar em diferentes locais da célula e possivelmente o dsRNA seja entregue a Dcr-2 ou estas enzimas irão aos compartimentos que apresentam os fatores virais (Faria et al., 2013). Além da

localização subcelular da *Dicer*, características comuns presentes em um dsRNA viral permitem o seu reconhecimento por estas enzimas em insetos, assim como pelos RLRs (do inglês, *RIG-I-like receptors*) em mamíferos. Modificações na porção terminal do dsRNA, como estruturas secundárias e presença de trifosfato em 5' podem ativar estes sensores (Faria et al., 2013).

1.2.3 Características das respostas antivirais em insetos

Apesar da via de RNAi ser um mecanismo de silenciamento gênico altamente conservado entre muitos organismos, algumas características a nível celular se diferem entre si. Em *Drosophila*, assim como em outros animais, o dsRNA é eficientemente entregue ao citoplasma celular o que é importante para a defesa antiviral; porém, não se sabe se as células de *Drosophila* têm a capacidade de transmitir o dsRNA às demais (Roignant et al., 2003). Nestes organismos, a via de RNAi parecia agir localmente, de forma autônoma e não ocorrendo um processo sistêmico de disseminação do dsRNA (Roignant et al., 2003). Porém, um trabalho realizado por Saleh e colaboradores, demonstrou que ao infectarem moscas transgênicas expressando GFP com SINV (*Sidibis virus*) que também expressava GFP, houve uma supressão da expressão de GFP em locais distantes do sítio de infecção (Saleh et al., 2009).

Em alguns outros organismos, como em *C. elegans*, é necessário que haja a disseminação do dsRNA para a ativação da via de RNAi (Winston, Molodowitch, & Hunter, 2002). Porém os mecanismos de entrada assim como a transmissão dos duplex de RNA são ainda poucos conhecidos. Alguns trabalhos demonstraram que a entrada do dsRNA em células S2 de *Drosophila* é mediada por receptores de endocitose (Saleh et al., 2006; Ulvila et al., 2006). Outros estudos apontam ainda a participação da molécula SID-1 para a entrada do dsRNA nestas células (Saleh et al., 2006). É sabido que esta molécula, uma proteína de membrana, é fundamental para a disseminação sistêmica do dsRNA em *C. elegans* (Tijsterman et al., 2004; Timmons et al., 2003). Porém, *sid-1* não é encontrado endogenamente no genoma de *Drosophila* mas quando é expresso de forma ectópica, ocorre um aumento das respostas mediada pela via de RNAi (Feinberg & Hunter, 2003).

Naturalmente, os insetos podem carregar infecções simultâneas ao longo da vida, sem necessariamente desenvolver a doença (Kanthong et al., 2010). Enquanto a infecção viral em vertebrados se desenvolve primeiramente de forma aguda, em invertebrados exposto ao vírus, a infecção torna-se persistente, não ocorrendo a eliminação do patógeno (Bowers et al, 1995; Bowers et al, 2003). Este fato, aliado à interação do vírus com o sistema imune do vetor, é um dos fatores que permite a eficiente transmissão viral ao hospedeiro. Goic e colaboradores (2013) mostraram que fragmentos de diversos vírus podem ser retro-transcritos precocemente durante uma infecção em *Drosophila*, resultando em formas de DNA incorporadas a retrotransposons. Estas quimeras produzem transcritos que serão processados pela via de RNAi, o que controla a replicação viral e gera um equilíbrio estável durante a infecção persistente (Goic et al., 2013). Ainda em relação à manutenção de uma infecção persistente em insetos, Kanthong e colaboradores observou não haver diferença na taxa de crescimento e morfologia celular em células C6/36 de mosquitos co-infectadas com *Aa/DNV (densovirus)* e *Dengue vírus 2 (DEN-2)* comparado as células *naive* (Kanthong et al., 2008).

Além de ser comum encontrar insetos infectados com mais de um vírus, deve-se considerar a existência de vetores hematófagos que se alimentam várias vezes de diferentes hospedeiros, como o mosquito *Aedes aegypti* e que são transmissores de arboviroses. Outro fato importante é durante a epidemia de uma arbovirose, o inseto vetor poderia ser exposto a infecção múltiplas pelo mesmo vírus. Neste contexto, alguns estudos foram realizados para o entendimento do efeito de uma infecção prévia na susceptibilidade do inseto vetor frente a uma segunda infecção. Apesar da inexistência do sistema adaptativo em insetos como ocorre em mamíferos, alguns estudos demonstraram que a exposição prévia a um determinado patógeno protegeria contra a exposição secundária pelo mesmo microrganismo. A este processo foi referido o termo de *immune priming*; no entanto pouco se conhece a cerca deste mecanismo em invertebrados. Em 2007, um trabalho realizado por Pham e colaboradores mostrou que moscas infectadas com a bactéria *Streptococcus pneumonia* foram protegidas contra a exposição letal da infecção homóloga, mas não contra outras bactérias taxonomicamente distintas (Pham et al, 2007). Neste caso, as vias de *Toll* e fagocitose foram envolvidas na defesa antibacteriana nas moscas infectadas. O fenômeno de proteção contra uma infecção homóloga em indivíduos

expostos previamente ao mesmo patógeno também foi observado em outros invertebrados, como em *Tribolium castaneum* (Roth et al, 2009) e *Daphnia magna* (Little et al, 2003).

Em relação à defesa antiviral em invertebrados, foi proposto que a via de RNAi seja o principal mecanismo envolvido em uma resposta específica à uma subsequente infecção. Longdon e colaboradores propuseram que indivíduos infectados com uma dose sub-letal de um vírus seria capaz de ativar a via de RNAi e a produção dos viRNAs poderia conferir uma proteção contra a segunda exposição ao mesmo vírus. (Longdon et al, 2013). Porém, neste trabalho, o tempo de sobrevivência das moscas infectadas previamente com DCV e reinfectadas com uma dose letal do mesmo vírus foi o mesmo do grupo controle, sugerindo que não houve um mecanismo de proteção nos indivíduos expostos às duas infecções.

Diferentemente, ao introduzirem um dsRNA exógena correspondente a algumas sequências do genoma de SINV (*Sindibis Virus*), Saleh e colaboradores (2009) observaram a diminuição da replicação do vírus nas moscas selvagens infectadas com o SINV. Em moscas deficientes para a via de RNAi, este mecanismo de proteção nos indivíduos previamente infectados não foi observado, indicando a importância da via p na susceptibilidade dos indivíduos à segunda infecção (Saleh et al., 2009). Neste trabalho, foi proposto que o dsRNA gerado durante uma infecção viral seria capaz de entrar em uma célula não infectada, após a lise ou morte de células infectadas. O dsRNA de origem viral seria processado pela via de RNAi e protegeria a célula não infectada de uma infecção subsequente pelo mesmo vírus, além de evitar a disseminação viral.

A existência de um possível caráter sistêmico de disseminação do dsRNA viral aliado a outros trabalhos que demonstraram a existência de um mecanismo de interferência sobre a segunda infecção em moscas previamente expostas ao mesmo patógeno nos levou a desenvolver a hipótese central de nosso trabalho. Esta hipótese foi baseada na ideia de que os viRNAs produzidos durante uma infecção primária agiriam contra o mesmo vírus exposto posteriormente aos mesmo indivíduos. Para validar esta hipótese, foi necessário estabelecer modelos de estudos que permitissem o uso de diversas estratégias experimentais para o entendimento da interação entre patógenos e hospedeiros; estes modelos estão descritos no próximo tópico deste trabalho.

1.3 Modelos de estudo

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, é um modelo animal utilizado em várias áreas da biologia, como genética e imunologia, por apresentar processos biológicos conservados com outros organismos. Mais especificamente, muitos estudos sobre a imunidade inata e resposta antiviral em mamíferos e invertebrados foram realizados utilizando a mosca da fruta. Por ser hospedeiro natural de muitos vírus, a *Drosophila* se torna um excelente modelo de estudo da interação entre hospedeiro e patógeno. Outros aspectos presentes neste organismo, tornam a mosca um modelo animal muito utilizado como fato de apresentar o seu genoma totalmente sequenciado (Adams et al., 2000) e anotado, tornando mais fácil a construção de moscas mutantes. Além do mais, muitos genes humanos apresentam ortólogos em *Drosophila*, o que permite o estudo de doenças em mamíferos (Bier, 2005; Schneider, 2000). O cultivo e manutenção de moscas são mais fáceis e baratos comparados ao cultivo e manutenção de outros animais, como camundongos. Todos estes fatores tornam-se vantajoso trabalho utilizando a mosca da fruta.

Para o estudo da resposta antiviral em invertebrados é necessário ainda o estabelecimento dos modelos de vírus. O VSV é um arbovírus de fita simples negativa de RNA, pertencente à família *Rhabdoviridae* e ao gênero *Vesiculovirus*. Por ser um vírus bem caracterizado, torna-se fácil a construção de mutantes. É um vírus de fácil crescimento e um genoma pequeno, com tamanho de aproximadamente 11 kb, que codifica proteínas não estruturais - nucleoproteína (proteína N), fosfoproteína (proteína P), polimerase (proteína L) e proteínas estruturais - glicoproteína (proteína G) e matriz (proteína M). Estas características permitiram o uso do VSV em muitos trabalhos para o entendimento de vias antivirais no modelo de *Drosophila*.

Assim como o VSV, o SINV, também um arbovírus, já foi utilizado em muitos trabalhos que avaliaram as vias de imunidade inata em *Drosophila*, como a via de RNAi. O SINV, pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Aphavirus*, se trata de um vírus de fita simples positiva que apresenta duas ORFs, das quais uma codifica proteínas estruturais e a outra codifica proteínas não estruturais, relacionadas a replicação do vírus (Strauss & Strauss, 1994). Portanto, o estudo da interação dos vírus descritos anteriormente no modelo de *Drosophila* permite o entendimento de vários aspectos da patogênese viral e da imunidade inata do vetor.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Doenças causadas por arbovírus tem grande impacto na saúde pública mundial. A transmissão dos arbovírus para seus hospedeiros vertebrados depende do inseto vetor. Assim, é de extrema importância o estudo da interação entre os arbovírus e insetos vetores. Vários fatores podem afetar a interação incluindo a presença de co-infecções. Isto é relevante uma vez que insetos vetores, como os mosquitos, tendem a se alimentar múltiplas vezes em uma mesma noite e poderiam ter contatos múltiplos com arbovírus de indivíduos diferentes. Além disto, os insetos podem carregar infecções por diferentes vírus simultaneamente ao longo da vida. Desta forma, pode haver interações entre os mesmos vírus ou até mesmo entre vírus distintos no mesmo inseto vetor.

Alguns trabalhos avaliaram a resposta imune em moscas expostas mais de uma vez a alguns tipos de bactérias e outros patógenos. Porém, pouco se conhece a respeito na resposta antiviral em moscas infectadas mais de uma vez pelo mesmo vírus, ou por vírus distintos. Não está claro como uma infecção primária pode alterar o desenvolvimento de uma infecção secundária em insetos a ponto de interferir na transmissão ao hospedeiro vertebrado. Estudos sobre a interação entre infecções virais em um modelo invertebrado, como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, pode ajudar a entender interações positivas e negativas que ocorrem durante a transmissão de arbovírus por mosquitos na natureza. Este conhecimento poderia eventualmente ser aplicado em estratégias de controle da transmissão de arboviroses. Assim, o objetivo principal do nosso trabalho é avaliar a resposta antiviral do inseto vetor no contexto de infecções recorrentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar um modelo de co-infecção viral em moscas *Drosophila melanogaster*.

3.2 Objetivos específicos

1. Padronizar um modelo de infecções duplas por vírus homólogos ou heterólogos em moscas *Drosophila melanogaster* utilizando o VSV e o SINV;
2. Caracterizar o efeito de uma infecção viral primária sobre uma infecção secundária homóloga ou heteróloga;
3. Avaliar o papel da via de RNAi em nosso modelo de infecção dupla, utilizando moscas mutantes;
4. Analisar a participação de outras vias de imunidade inata em moscas infectadas duas vezes pelo mesmo vírus através da dosagem da expressão gênica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo da linhagem celular

Utilizamos células VERO para a multiplicação e titulação dos estoques virais. Esta linhagem é derivada do epitélio de rim de macaco verde da espécie *Cercopithecus aethiops* e são originárias da *American Type Culture Collection* (ATCC), Maryland, USA. Cultivamos as células em meio mínimo de Eagle (MEM-Cultilab, Brasil) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - CULTILAB, Brasil), gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L). Para o crescimento celular, as células foram incubadas em estufa a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Os repiques celulares para os subcultivos foram feitos com solução de tripsina EDTA [NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM; NaHCO₃ 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol].

4.2 Preparação dos estoques virais

O VSV selvagem do subtipo *Indiana vírus* foi cedido pela professora Erna Kroon do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais e o VSV transgênico que expressa a proteína GFP (VSV-G) é originário da *Northwestern University*, cedido pelo Dr. Curt Horvath. Ambos os vírus foram crescidos em células VERO, em garrafas de 125 cm² com aproximadamente 80% de confluência celular. Utilizamos uma MOI de 0,001 do VSV por célula em um volume de 5 mL de meio MEM suplementado com 5% de SFB (Gibco), gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L). Após 1 hora de adsorção, descartamos o meio da garrafa infectada e lavamos o inóculo viral com solução PBS 1X. Adicionamos 25 mL de meio MEM de meio MEM suplementado com 5% de SFB à garrafa com as células infectadas, da qual foi mantida em estufa de CO₂ a 37° C. O efeito citopático destes vírus foi observado em aproximadamente 20 a 36 horas após a infecção. Após este período de incubação, a garrafa infectada foi congelada a -80°C e descongelada à temperatura ambiente para que ocorresse a lise celular e liberação das partículas virais que ainda poderiam estar dentro das células. Posteriormente, coletamos o meio juntamente com as células lisadas que foram submetidos à centrifugação a 1800 G

por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então aliquotado e armazenado à -80°C até o momento do uso.

O SINV-GFP (SINV-G) foi cedido pela Dra. Ilya Frolov e para a sua multiplicação realizamos os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o VSV e VSV-G. Porém, para a infecção, utilizamos uma MOI de 0,1 do vírus por célula VERO.

4.3 Concentração do SINV-G

Para a concentração do SINV-G, crescemos o vírus original em células VERO e adaptamos o protocolo de Grimes e Burge (Grimes & Burg, 1971). Após o congelamento e descongelamento das células infectadas coletamos o meio e centrifugamos a 1.800 G por 10 minutos, à 4°C para a clarificação. Adicionamos então, 10% p/v de PEG (*polyethylene glycol*) 8000 (SIGMA) e NaCl a uma concentração final de 0.5 M e centrifugamos a 16.000 G por 1 hora, à 4°C para a precipitação do vírus. Desprezamos o sobrenadante e homogeneizamos o pellet em tampão TE contendo 0.2M de NaCl e 10% de glicerol. Como controle do experimento, separamos uma alíquota de células infectadas com SINV-G antes da concentração e titulamos pelo método de PFU assim como para o vírus concentrado.

4.4 Titulação dos vírus por contagem de unidade formadora de placa (PFU)

Para a titulação do VSV, VSV-G e SINV-G pelo método de PFU, utilizamos placas de seis poços dos quais, em cada um, havia a monocamada de células VERO com uma confluência de aproximadamente 80%. A cada poço foi destinado uma diluição do vírus; estas diluições foram feitas em meio MEM com 5% de SFB. Após 1 hora de adsorção, acrescentamos a cada poço meio DMEM suplementado com 2% de SFB e carboximetilcelulose (CMC) a 1,5%. As células foram mantidas a 37° C, em ambiente com 5% de CO₂ até o aparecimento do efeito citopático de cada vírus para contagem das placas lise e então foram fixadas com solução formol a 10% por 30 minutos. Em seguida as células foram coradas com solução 1% (p/v) de cristal de violeta em PBS por 15 minutos. Para o cálculo do título, foi considerado o número de

30 a 300 placas de lise que houvesse no poço com a maior diluição do vírus, multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para pfu/mL.

4.5 Titulação do VSV pelo método TCID₅₀

Após a multiplicação do VSV em células VERO, este vírus também foi titulado pelo método de TCID₅₀, que considera a diluição viral necessária para infectar 50% das células inoculadas (Reed e Muench, 1938). Neste ensaio, selecionamos uma placa de 96 poços, contendo cerca de 5×10^4 células VERO/poço e infectamos com o VSV, onde cada poço correspondia a uma diluição do vírus. Posteriormente, a placa foi incubada em estufa a 37° C, com 5% de CO₂ até o aparecimento do efeito citopático para a sua leitura. O título final do vírus em TCID₅₀/mL foi dado pelo cálculo da distância proporcional (DP) entre duas diluições, considerando a seguinte fórmula: $DP = (\% \text{ acima de } 50\% \text{ de células com efeito do vírus} - 50\%) / (\% \text{ acima de } 50\% \text{ de células com efeito do vírus} - \% \text{ abaixo de } 50\% \text{ de células com efeito do vírus})$. A este valor é somado o log da menor diluição onde foi observado o efeito citopático e então é calculado o título elevando-se o valor à base 10.

4.6 Estoque e manutenção das moscas

Para os experimentos de microinjeção *in vivo*, moscas da linhagem *Canton S* e mutantes para *Dcr-2* e *R2D2* (*GMR; R2D25165XDcr-2L811fsX/CyO*) foram mantidas em estufas com temperatura de 25°C, em tubos contendo comida a base de cereal, glicose e levedura. Características distintas, como cor dos olhos, diferenciavam as moscas mutantes homozigotas, deficientes para a via de siRNA, e as moscas mutantes heterozigotas, usadas como controle dos experimentos. Anteriormente às infecções, moscas adultas do estoque eram selecionadas para a expansão de cada linhagem e para a postura dos ovos por 2-3 dias. Então, os adultos eram retirados dos tubos e após 10 a 12 dias havia a eclosão de novas moscas das quais eram separadas as fêmeas para as infecções.

4.7 Microinjeção em moscas adultas

Moscas fêmeas adultas com idade entre 2 a 5 dias foram separadas para a realização dos experimentos de infecção com os vírus VSV, VSV-G e SINV-G. Para estes procedimentos, primeiramente anestesiámos as moscas com CO₂ e as mantivemos sobre uma superfície com o fluxo contínuo do mesmo gás. As injeções foram realizadas pelo microinjetor Nanoject II™ (Drummond©) na região intratorácica de cada mosca. O inóculo da microinjeção continha 69 nL de vírus puro ou diluído em meio Schneider (Gibco®) juntamente com corante, dependendo da concentração viral a ser utilizada em cada experimento.

4.8 Cinética de infecção viral *in vivo*

Ao realizarmos os experimentos de cinética de infecção e dose resposta do VSV e VSV-GFP, selecionamos moscas adultas entre 2-5 dias da linhagem *Canton S*. Para a injeção com VSV, dividimos as moscas em grupos baseado na concentração viral a ser injetada. Um grupo correspondia às moscas inoculadas com 50 pfu do VSV e o outro grupo às moscas infectadas com 500 pfu do mesmo vírus. O terceiro grupo de moscas correspondia ao controle do experimento do qual foi inoculado apenas com meio Schneider. Após 2 dias de infecção, coletamos metade das moscas infectadas e o restante das moscas foram coletadas com 4 dias de infecção. Para cinética de replicação do VSV-G e dose infectiva do vírus, adotamos a mesma estratégia experimental descrita anteriormente para o VSV, porém acrescentamos a dose 5000 pfu/moscas às infecções. A cinética de replicação do SINV foi feita utilizando os tempos de 2 e 4 dias de infecção e testamos três doses distintas do vírus: 500 pfu, 5000 pfu e 50000 pfu. A cada dois dias de infecção todas as moscas eram transferidas para novos tubos contendo comida. Após a coleta individual, todas as moscas foram armazenadas em freezer à temperatura de -80°C até o momento da extração de RNA total e processamento por RT-qPCR.

4.9 Infecções com VSV e VSV-G/SINV-G em moscas adultas

Para os experimentos que envolviam as infecções com dois vírus homólogos em moscas adultas, selecionamos moscas selvagens da linhagem *Canton S* e mutantes homozigotas e heterozigotas para *Dcr-2* e *R2D2* e injetamos com 5000 pfu do VSV. Quatro dias após esta infecção primária, re-infectamos as mesmas moscas com 500 pfu/5000 pfu do VSV-G (figura 1). Além do grupo de moscas injetado com VSV e VSV-G, estabelecemos também outros três grupos controles: I) primeira injeção: moscas infectadas com VSV; segunda injeção: moscas inoculadas com meio Schneider (MOCK); II) primeira injeção: moscas inoculadas com meio Schneider (MOCK); segunda injeção: moscas infectadas com VSV-GFP; III) moscas inoculadas somente com meio Schneider em ambas as injeções (figura 3). O tempo de infecção após a injeção do segundo vírus variou entre 2-6 dias de acordo com o experimento realizado, assim como a sua dose. Para as infecções utilizando um vírus heterólogo na segunda injeção, selecionamos o SINV para infectar moscas selvagens da linhagem *Canton S*. O VSV foi utilizado na primeira injeção e 500 pfu do SINV foram utilizados para a segunda infecção. Os mesmos grupos controles que foram criados para as infecções utilizando o VSV-G na segunda injeção também foram selecionados para as infecções com SINV-G (figura 3). O tempo de infecção após a inoculação do SINV foi de 2 e 4 dias. A cada dois dias de infecção todas as moscas eram transferidas para novos tubos contendo comida. Após o tempo de infecção da segunda injeção, todas as moscas foram coletadas individualmente e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA e processamento por RT-qPCR.

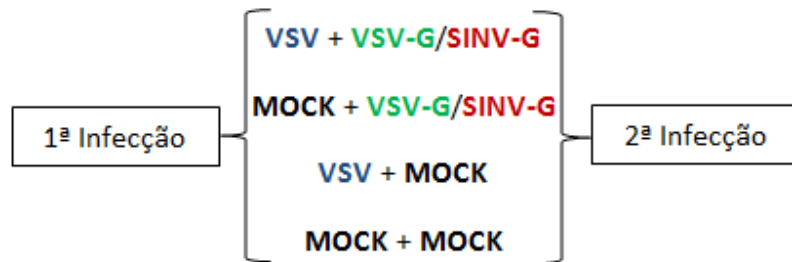


Figura 3 - Representação esquemática das infecções duplas em moscas adultas. Quatro grupos de moscas adultas foram criados para as infecções com dois vírus. A primeira infecção foi feita somente com o VSV selvagem enquanto a segunda foi realizada com a injeção de VSV-GFP ou SINV-GFP.

4.10 Titulação das moscas infectadas com VSV e VSV-GFP

Após a infecção com VSV e VSV-G em moscas selvagens da linhagem *Canton S*, realizamos a titulação das mesmas com a finalidade de avaliar o crescimento do vírus. Para este procedimento, selecionamos moscas com 3 e 6 dias de infecção e as maceramos com pistilo após a adição de 200 μ L de meio MEM suplementado com 10% de SFB. As amostras foram centrifugadas a 4000 g por 5 minutos em minicentrífuga e em seguida filtramos o sobrenadante em filtros MILLEX™ com poro de 0,22 μ m. O sobrenadante filtrado foi diluído de forma seriada e transferido às placas de 6 poços contendo previamente a monocamada de células VERO. As placas foram mantidas em estufa de CO₂, a 37°C até o aparecimento do efeito citopático do vírus para o cálculo do título viral em cada mosca pelo método de PFU. Para o cálculo da porcentagem de placas GFP positivas consideramos 10 placas de lise por poço e quantificamos as que expressaram GFP. A porcentagem foi dada após a determinação do título final relativo à quantidade de placas GFP positivas de cada amostra.

4.11 Extração do RNA total de moscas infectadas

As moscas infectadas foram maceradas individualmente no equipamento *Mini-BeadBeater-16* (Biospec©) por 1,5 minutos após a adição de 200 µL de TRIzol® *Reagent* (Invitrogen™). Depois de maceradas, os tubos contendo as moscas ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos para adição de 40 µL de clorofórmio (Sigma®) e em seguida vortexados por 15 segundos. Novamente as amostras ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos até que pudessem ser centrifugadas a 12000 g por 10 minutos, a 4 °C. Este procedimento permitiu que houvesse a separação das fases, onde a fase aquosa, que estava o RNA total, foi transferida para outro tubo do qual já continha previamente 10 µg de glicogênio ultrapuro (Ambion®). Em seguida, adicionamos a cada amostra 100 µL de isopropanol (Sigma®) para a precipitação do RNA e agitamos levemente por inversão cada tubo. Após a incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos a 4°C em minicentrífuga. Para a lavagem do RNA, descartamos o sobrenadante e adicionamos em cada tubo 750 µL de etanol 75% v/v (Sigma®) e submetemos as amostras a uma nova centrifugação a 7500 g, por 7 minutos, a 4°C. A secagem do pellet, do qual continha o RNA, foi feita em papel absorvente por inversão dos tubos. Após a secagem, ressuspendemos o RNA em 10 µL de água livre de nucleases (*Nuclease-Free Water* – Ambion®) e mantivemos as amostras em banho de gelo para a hidratação do RNA por cerca de 30 minutos. Passado este tempo, armazenamos todas as amostras em freezer -80°C até o momento do uso.

4.12 Transcrição reversa

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído das moscas infectadas, utilizamos 2 µL de cada amostra juntamente com 500 ng dos iniciadores randômicos (*Random Primers*). Para a desnaturação do RNA, submetemos esta mistura à temperatura de 70°C por 10 minutos em equipamento termociclador, seguido da temperatura de 4°C. Após este procedimento adicionamos às amostras 2 unidades da enzima Transcriptase Reversa M-MLV, com tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 0,2 µM de DTT e água

livre de nucleases (Ambion®) para o volume final de 20 mL. Assim, as amostras e os demais reagentes foram incubadas a temperatura de 42°C, em termociclador, por 1 hora seguido da temperatura de 72°C, por 5 minutos. O controle da reação de transcrição reversa foi constituído por cada amostra e reagentes, exceto pela adição da enzima. Após a reação no termociclador, as amostras foram armazenadas a temperatura de -80°C, até o momento do uso.

4.13 PCR quantitativo (qPCR)

Utilizamos a técnica de PCR em tempo real para a quantificação da carga viral e dosagem da expressão de GFP nas moscas infectadas através do equipamento *StepOnePlus™ RealTime PCR System* (Applied® Biosystems). Para a reação, preparamos a mistura contendo 5 µL do cDNA, 193 µM de dNTPs, o fluoróforo *SYBR® GREEN* (Applied® Biosystems), 2 unidades da enzima Taq polimerase, o tampão da enzima (100 mM Tris pH 8,3; 500 mM KCl; 0,1 % Triton x100) e água livre de nucleases (Ambion®) para o volume final de 15 mL. Adicionamos também 400 nM dos iniciadores, descritos na tabela 1, após o teste de eficiência destes *primers*, utilizando diluições seriadas de 10x em diferentes amostras de DNA. Os valores de *baseline* e *threshold* foram ajustados de acordo com cada par de iniciadores. Para a análise das reações, utilizamos o método do $2^{-\Delta Ct}$, calculado em relação ao gene constitutivo *RpL32 (Ribosomal particle L32)*, considerando a média do Ct de cada replicata técnica.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (Graphpad® Software). Para a avaliação dos dados, utilizamos o teste *t* de *Student* seguido de pós-teste de *Mann-Whitney*.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para qPCR

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Organismo
Rp132	(Left) GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG (Right) AAACGCGGTTCTGCATGAG	<i>D. melanogaster</i>
VSV	(Left) CTTTAGAAGGGAATTGGAAGAA (Right) TCTGCCGACTTGATAGGATTG	<i>Vesicular Stomatitis virus</i>
SINV	(Left) CGTTCAGCTGCAAGACCA (Right) TACCGGCCGTGGCTAGTAT	<i>Sindibis virus</i>
GFP	(Left) CGACCACTACCAGCAGAACA (Right) TCTCGTTGGGGTCTTTGC	Sintético

5. RESULTADOS

5.1 Crescimento dos estoques virais

A primeira etapa deste trabalho foi o crescimento dos vírus que seriam utilizados para as infecções *in vivo*. Estes vírus foram o VSV selvagem, o VSV transgênico que expressa a proteína GFP (VSV-G) e o SINV transgênico que também expressa GFP (SINV-G) dos quais foram crescidos em células VERO. Em relação à infecção do VSV selvagem nestas células, observamos o efeito citopático causado pelo vírus aproximadamente 20 horas após a sua infecção. Este efeito é caracterizado pela presença de células mortas desprendidas da monocamada celular, formando as placas de lise viral. A titulação do VSV foi feita pela contagem de unidade formadora de placa (PFU) por mL pelo método de TCID₅₀/mL do qual se baseia na diluição viral necessária para infectar 50% das células inoculadas com o vírus. O título do VSV quantificado por ambas as técnicas foi feito em células VERO e estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Título do VSV em células VERO pelos ensaios de PFU/mL e TCID₅₀/mL

PFU/mL	TCID ₅₀ /mL
2,12x10 ⁸	10 ^{8,45}

O VSV-G assim como o SINV-G também foi multiplicado em células VERO e titulado nas mesmas células. Observamos o efeito citopático do VSV-G e do SINV-G após aproximadamente 36 horas e 43 horas de infecção, respectivamente. Este efeito citopático compreendia a presença de células mortas desprendidas da monocamada, com aspectos arredondados, caracterizando a perda da morfologia celular (Figura 4).

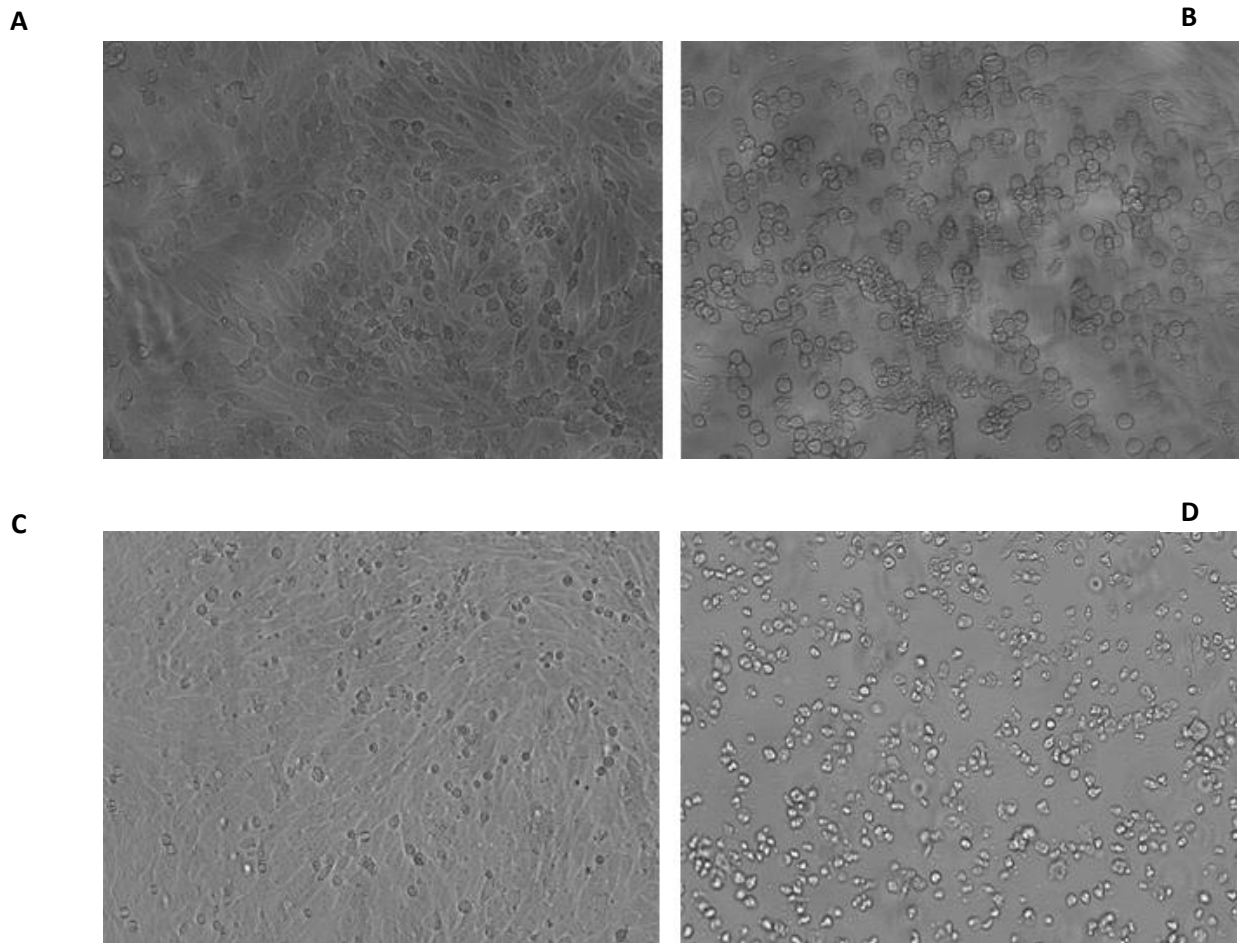


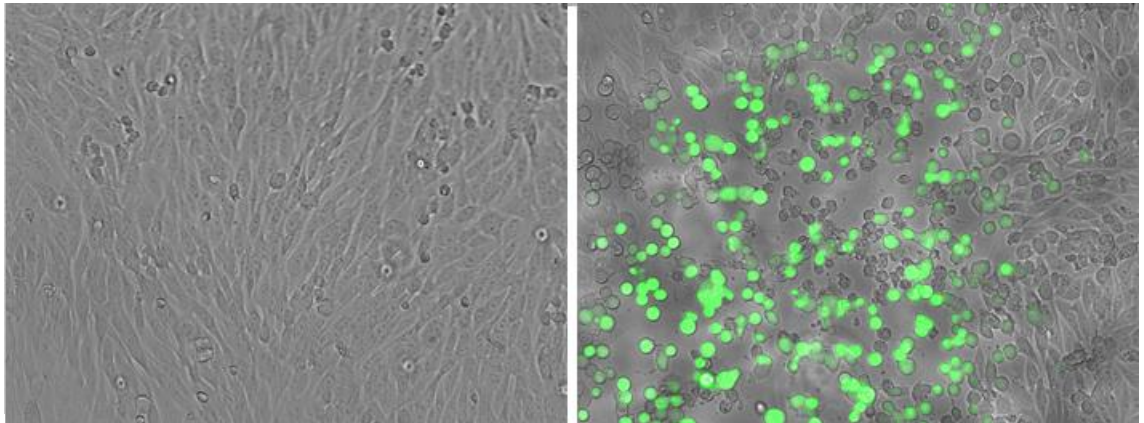
Figura 4 -Efeito citopático causado pelo VSV e SINV em células VERO Fotografias de células VERO infectadas com VSV (B) e SINV (D) após 36 e 43 horas de infecção respectivamente. As células que foram inoculadas somente com meio celular representam o MOCK da infecção com VSV-G (A) e o MOCK da infecção com SINV-G (C).

Como o VSV-G e SINV-G apresentam a sequência gênica da proteína GFP inserida em seus genomas, foi possível visualizar a coloração verde nas células infectadas com estes vírus através da microscopia de fluorescência (Figura 5). Após a multiplicação em células VERO, titulamos ambos os vírus pelo método de PFU e obtivemos o melhor título para o VSV-G (Tabela 3).

Tabela 3 - Título do VSV em células VERO pelo método de PFU (PFU/mL)

VSV-GFP	SINV-GFP
$2,0 \times 10^9$	$7,5 \times 10^7$

A



B

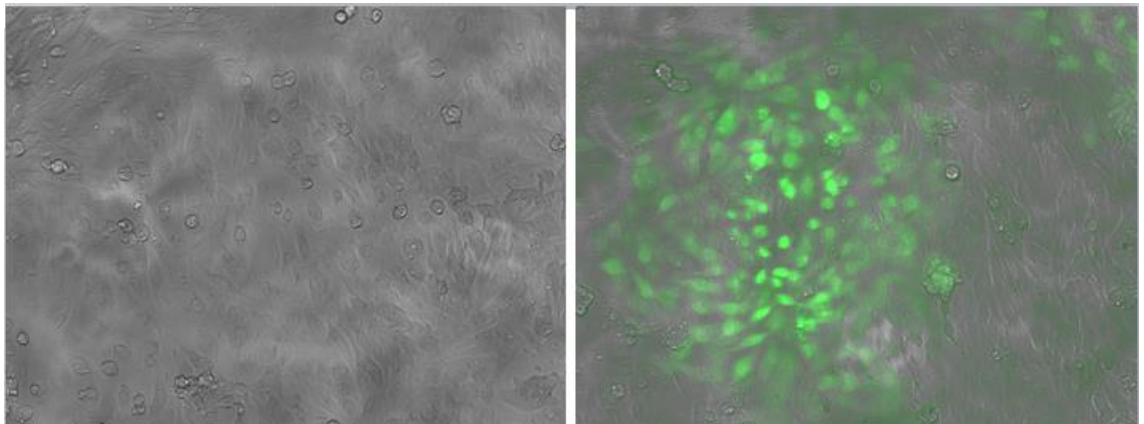


Figura 5 - Expressão da proteína GFP em células infectadas com SINV-G e VSV-G. Fotografia utilizando microscópio de fluorescência de células VERO infectadas com VSV-G após 36 horas de infecção (A, direita) e infectadas com SINV-G após 43 horas de infecção (B, direita). As células que foram inoculadas somente com meio celular representam o MOCK da infecção com VSV-G (A, esquerda) e o MOCK da infecção com SINV-G (B, esquerda).

Com a finalidade de aumentar o título do SINV-G, optamos em realizar a concentração do vírus, um procedimento que consiste na utilização de um polímero químico que precipita as partículas virais. Ao concentrarmos o vírus, conseguimos aumentar o seu título em um log, comparado ao controle do procedimento, do qual não fizemos a concentração viral (tabela 4).

Tabela 4 - Título do SINV-G antes e após a sua concentração (PFU/mL)

SINV-G não concentrado	SINV-G concentrado
$5,2 \times 10^7$	$1,85 \times 10^8$

5.2 Cinética de replicação viral e dose resposta do VSV

O VSV é um arbovírus que sabidamente infecta e se replica em células de *Drosophila* assim como em células de outros invertebrados (Mudd et al., 1973; Wyers, 1983). Baseado neste conhecimento, realizamos uma cinética de replicação viral e dose resposta do VSV em moscas selvagens com o objetivo de padronizar as infecções *in vivo* utilizando este vírus. Inicialmente, estabelecemos três doses distintas do VSV-G para infectar moscas da linhagem *Canton S* e utilizamos dois tempos de infecção: 2 e 4 dias. Houve a replicação do vírus utilizando as três diferentes doses do vírus e em ambos os tempos de infecção (Figura 6A). Para avaliar a multiplicação do VSV infectamos as moscas com as doses de 50 e 500 pfu e mantivemos os tempos de 2 e 4 dias de infecção. Não utilizamos 5000 pfu nestas infecções, por esta dose ter gerado a saturação da replicação do VSV-G (figura 6A). Como observado na figura 6B, houve o crescimento do VSV em ambos os tempos de infecção e doses utilizadas. Apesar da multiplicação mais rápida do VSV-G, comparado ao vírus selvagem, utilizamos os dois vírus nos próximos experimentos de co-infecção.

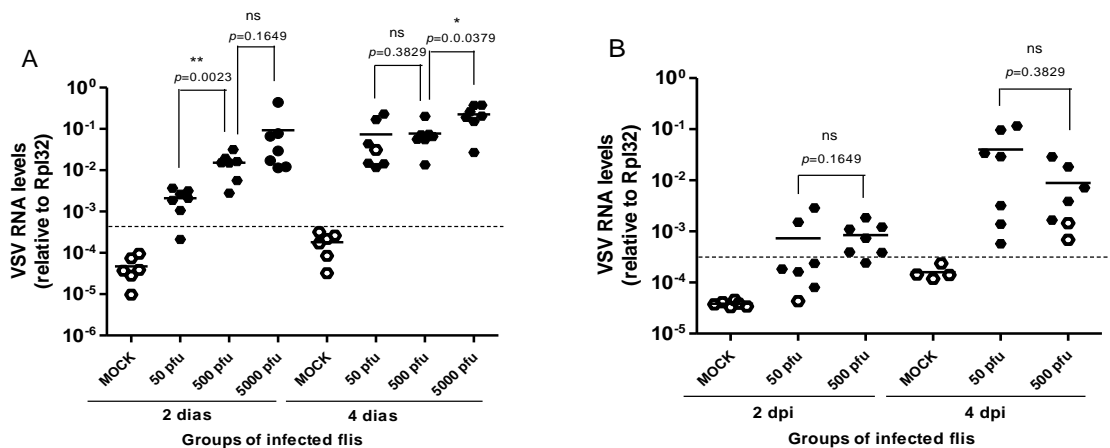


Figura 6- Cinética de replicação viral após a injeção de diferentes doses do VSV e VSV-GFP em moscas adultas. Três grupos de moscas selvagens *Canton S* foram infectados separadamente por injeção intratorácica com 50, 500 e 5000 pfu de VSV-GFP (A). As doses de 50 e 500 pfu foram utilizadas na infecção com VSV (B). Após os tempos de 2 e 4 dias de infecção, todas as moscas foram coletadas individualmente para a extração de RNA e processamento por RT-qPCR. Os níveis de RNA viral foram normalizados pela expressão do gene endógeno *Rpl32*. Os símbolos fechados representam os indivíduos infectados e os símbolos abertos, os indivíduos não infectados. $p < 0.005$ representam valores significativos e *ns* valores não significativos.

5.3 Infecções com VSV e VSV-GFP em moscas selvagens

A ideia de que uma exposição prévia a um determinado patógeno em células de invertebrados seria capaz de promover um efeito protetor contra uma segunda exposição pelo mesmo microrganismo, nos levou a realizar os próximos experimentos que envolveram duas infecções pelo mesmo vírus em moscas adultas. Assim, nós inoculamos o VSV em moscas selvagens (linhagem *Canton S*) e após quatro dias de infecção, injetamos o VSV-GFP nos mesmos indivíduos. A dosagem da expressão da proteína GFP nas moscas infectadas avaliaria o possível efeito protetor ocasionado pela primeira infecção, uma vez que esta proteína seria proveniente somente do segundo vírus.

Para a primeira injeção, estabelecemos a dose de 5000 pfu por indivíduo, por ser uma dose que permitiria a saturação da replicação viral. A dose de 500 pfu de VSV-G por indivíduo foi utilizada na segunda injeção, por ser tratar de uma dose sub-saturante, como foi observado no experimento de cinética e dose resposta do VSV-GFP. Estabelecemos ainda o tempo de dois dias de infecção após a inoculação do segundo vírus. Em outro experimento independente, utilizamos o tempo de quatro dias de infecção após injetarmos o VSV-GFP. A figura 7 representa os dias de infecção e

as doses utilizadas na primeira e na segunda injeção nos dois experimentos realizados.

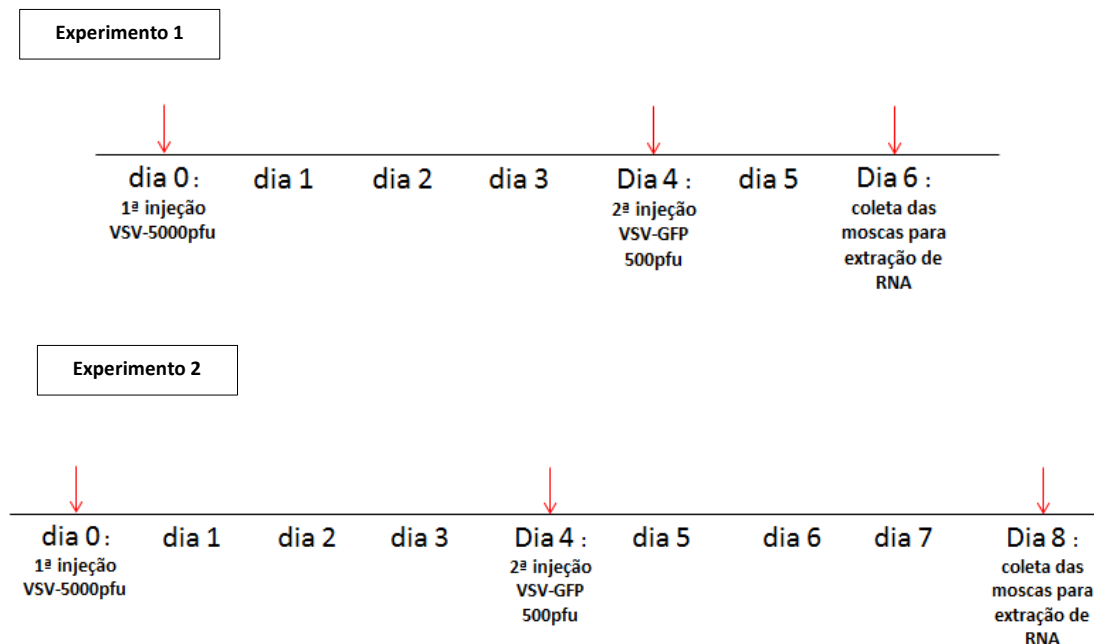


Figura 7 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a injeção em moscas adultas nos experimentos 1 e 2. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram infectadas com 5000 pfu de VSV (dia 0). Quatro dias após a primeira injeção, os mesmos indivíduos foram infectados com 500 pfu VSV-GFP (dia 4). Dois dias após a segunda infecção todos os indivíduos foram coletados para a extração de RNA, no experimento 1 (dia 4). O tempo de quatro dias após a infecção pelo segundo vírus foi utilizada no experimento 2 (dia 8).

Ao dosarmos a carga viral nos grupos de moscas infectados, observamos que houve a replicação do VSV em ambos os experimentos (figura 8A e 8B). Em relação à dosagem da expressão da proteína GFP, observamos a sua diminuição significativa entre os indivíduos infectados com os dois vírus comparado aos indivíduos do grupo controle, inoculados somente com o VSV-GFP (figura 8C e 8D). Como a proteína GFP é indicativa da carga viral da segunda infecção, estes resultados demonstram que a presença do primeiro vírus comprometeu o progresso da segunda infecção nos indivíduos inoculados com VSV e VSV-G. Portanto, sugerimos a existência de um mecanismo de interferência contra a segunda infecção nas moscas infectadas previamente com o VSV nas condições de infecção apresentadas. Como medida da interferência, nós calculamos o número de vezes que a média de expressão do GFP viral foi maior no grupo infectado somente com VSV-GFP comparado ao grupo infectado com os dois vírus. Este valor será mencionado daqui para frente como *fold* de inibição e está representado em cada gráfico pelo FD (*fold difference*).

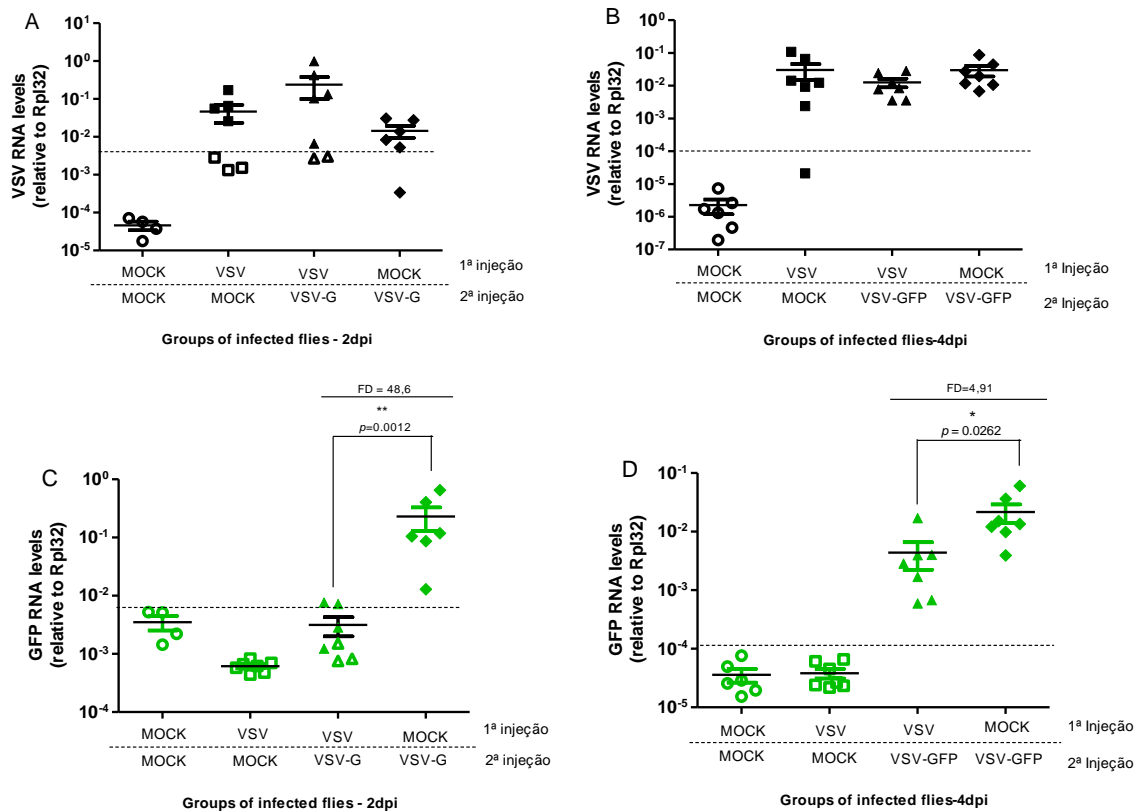


Figura 8 - Efeito da exposição prévia com VSV em moscas infectadas com VSV-GFP. Moscas com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV (primeira injeção) e após quatro dias foram re-infectadas com 500 pfu VSV-GFP (segunda injeção). Outros três grupos de moscas selvagens foram selecionados como controles do experimento: MOCK (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), VSV (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), MOCK (primeira injeção) e VSV-GFP (segunda injeção). Para todos os grupos foi feita a dosagem da carga viral (A, B) e a dosagem da expressão de GFP (C, D) por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo Rpl32. O valor do fold de inibição indicado (FD: *Fold difference*) representa a diferença de crescimento viral entre o grupo infectado com os dois vírus e o grupo infectado somente com o segundo vírus (C, D). A linha pontilhada nas figuras A, B, C e D referem-se ao valor de limite de detecção do qPCR. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não foram infectados com VSV (A, B) e os indivíduos que não apresentaram sinal para GFP (C, D). $p < 0.005$ representam valores significativos e *ns* valores não significativos.

Estes experimentos iniciais envolvendo duas infecções pelo mesmo vírus em moscas selvagens nos levou a questionar se o aumento da carga viral da segunda infecção poderia comprometer com mecanismo de interferência em moscas infectadas previamente com o VSV. Então, aumentamos a dose do VSV-GFP e mantivemos a dose de 5000 pfu do primeiro vírus. A figura 9 representa as condições de infecção deste experimento.

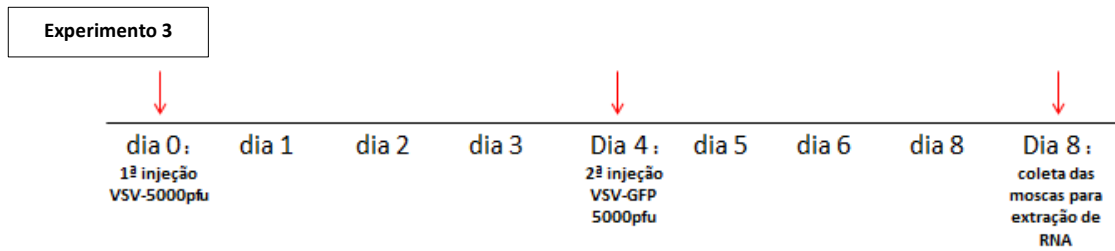


Figura 9 - Representação esquemática dos tempos de infecção e dose do VSV para a injeção em moscas adultas do experimento 3. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram infectadas com 5000 pfu de VSV (dia 0). Quatro dias após a primeira injeção, os mesmos indivíduos foram infectados com 5000 pfu de VSV-GFP (dia 4). Quatro dias após a segunda infecção todos os indivíduos foram coletados para a extração de RNA (dia 8).

Após o processamento das moscas individualmente e análise da dosagem da carga viral, observamos que houve a replicação do VSV nos grupos de moscas infectados (figura 10A). Ao analisarmos o perfil da expressão de GFP, notamos que não houve diferença significativa entre os grupos infectados com os dois vírus e o grupo controle, infectado somente com o VSV-GFP (figura 10B). Estes resultados indicam um efeito de saturação da replicação viral ocasionado pelo aumento da dose do VSV-GFP. Desta forma, a dose viral torna-se um fator limitante para o efeito de interferência existente nas moscas previamente infectadas contra o segundo vírus.

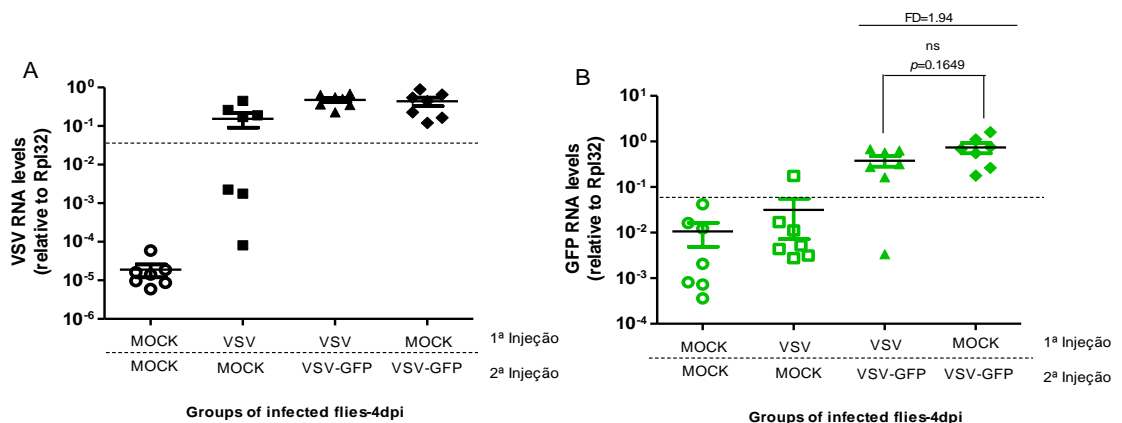


Figura 10 - Efeito da exposição prévia ao VSV em moscas selvagens após o aumento da dose do segundo vírus. Moscas com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV (primeira injeção) e após quatro dias foram re-infectadas com 5000 pfu do VSV-GFP (segunda injeção). Outros três grupos de moscas selvagens foram selecionados como controles do experimento: MOCK (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), VSV (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), MOCK (primeira injeção) e VSV-GFP (segunda injeção). Para todos os grupos foi feita a dosagem da carga viral (A) e a dosagem da expressão de GFP (B) por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo Rpl32. A linha pontilhada nas figuras A e B refere-se ao valor de limite de detecção do qPCR. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não foram infectados com VSV (A) e os indivíduos que não apresentaram sinal para GFP (B). O valor de FD (*Fold difference*) representa a diferença de

crescimento viral entre o grupo infectado com os dois vírus e o grupo infectado somente com o segundo vírus (B). *ns* representam valores não significativos.

Assim como a dose viral, resolvemos avaliar em seguida, o efeito do tempo de infecção sobre o mecanismo de interferência da replicação do segundo vírus. Para isto, definimos dois tempos distintos de infecção após a injeção do VSV-G: 3 e 6 dias, permanecendo o tempo de 4 dias entre a primeira e segunda infecção (figura 11). Mantivemos a dose de 5000 pfu para a primeira infecção e para ser possível avaliar a replicação do segundo vírus, voltamos a utilizar a dose sub-saturante de 500 pfu do VSV-GFP.

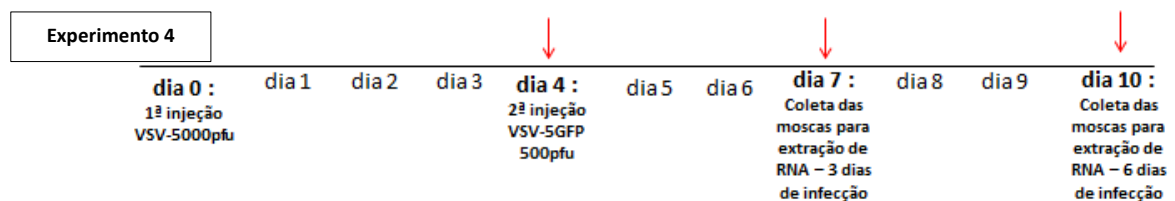


Figura 11 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a injeção em moscas adultas do experimento 4. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram infectadas no dia 0 com 5000 pfu de VSV. Quatro dias após a primeira infecção as mesmas moscas foram re-infectadas com 500 pfu de VSV-GFP (dia 4). Dois tempos para a coleta das moscas foram estabelecidos: 3 dias após a segunda infecção (dia 7) e 6 dias após a segunda infecção (dia 10). Os dias de infecção e os dias de coleta das moscas para a extração de RNA estão indicados com as setas.

Como demonstrado na figura 12A, houve a replicação do VSV na maioria dos indivíduos inoculados com o vírus em ambos os tempos de infecção. Ao dosarmos a expressão de GFP, observamos uma diferença significativa entre o grupo de moscas infectado com os dois vírus e o grupo infectado somente com o VSV-GFP com três dias de infecção após a injeção do segundo vírus (figura 12B). Porém, esta diferença não foi observada nas moscas que apresentaram seis dias de infecção (figura 12B). Observamos novamente que o *fold* de inibição diminui quando aumentamos o tempo de infecção. Desta forma, o aumento do tempo de infecção assim como o aumento da dose do segundo vírus são efeitos que limitam o mecanismo de interferência sobre a segunda infecção nas moscas infectadas previamente com VSV, por permitirem a saturação da replicação viral.

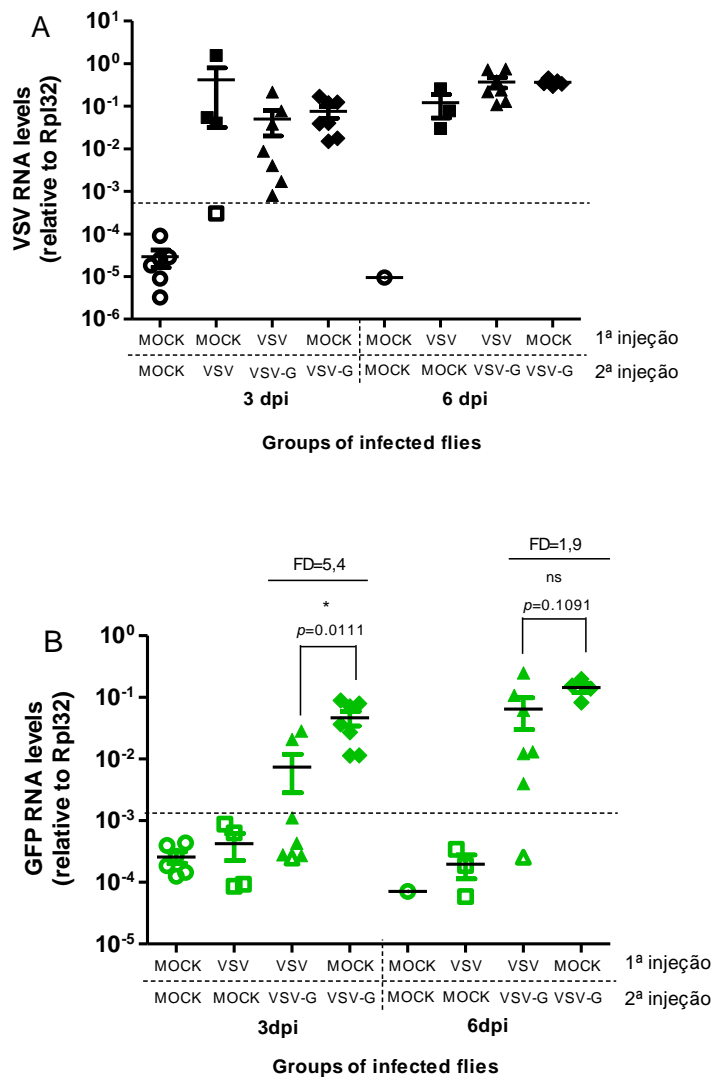


Figura 12 - Efeito da exposição prévia ao VSV em moscas selvagens após o aumento do tempo da segunda infecção. Moscas com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV (primeira injeção) e após quatro dias foram re-infectadas com 500 pfu do VSV-GFP (segunda injeção). Outros três grupos de moscas selvagens foram selecionados como controles do experimento: MOCK (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), VSV (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), MOCK (primeira injeção) e VSV-GFP (segunda injeção). Três dias após a segunda injeção, foi feita a primeira coleta das moscas e seis dias após a segunda injeção foi feita a segunda coleta de moscas. Para todos os grupos foi dosada a carga viral (A) e dosagem da expressão de GFP (B). Ambas as dosagens foram feitas por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo *rpl32*. A linha pontilhada nas figuras A e B refere-se ao valor de limite de detecção do qPCR. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não foram infectados com VSV (A) e os indivíduos que não apresentaram sinal para GFP (B). O valor de FD (*Fold difference*) representa a diferença de crescimento viral entre o grupo infectado com os dois vírus e o grupo infectado somente com o segundo vírus (B). $p < 0.005$ representam valores significativos e *ns* valores não significativos.

Para complementar os resultados obtidos pela dosagem da carga viral e expressão de GFP, selecionamos algumas moscas com 3 e 6 dias de infecção para serem tituladas. Após a titulação, observamos o crescimento do VSV nas moscas infectadas, demonstrado pelas unidades formadoras de placa (figura 13A). Apesar de

não haver diferença significativa do título viral entre os grupos de moscas infectados com os dois vírus e os grupos infectados somente com VSV-G, observamos uma diferença na porcentagem de placas que expressaram GFP por indivíduo entre os dois grupos com 3 e 6 dias de infecção (figura 13B). Houve menos quantidade de placas GFP positivas entre os indivíduos dos grupos infectados com os dois vírus, comparado com indivíduos pertencentes aos grupos infectados somente com o VSV-GFP em ambos os tempos de infecção.

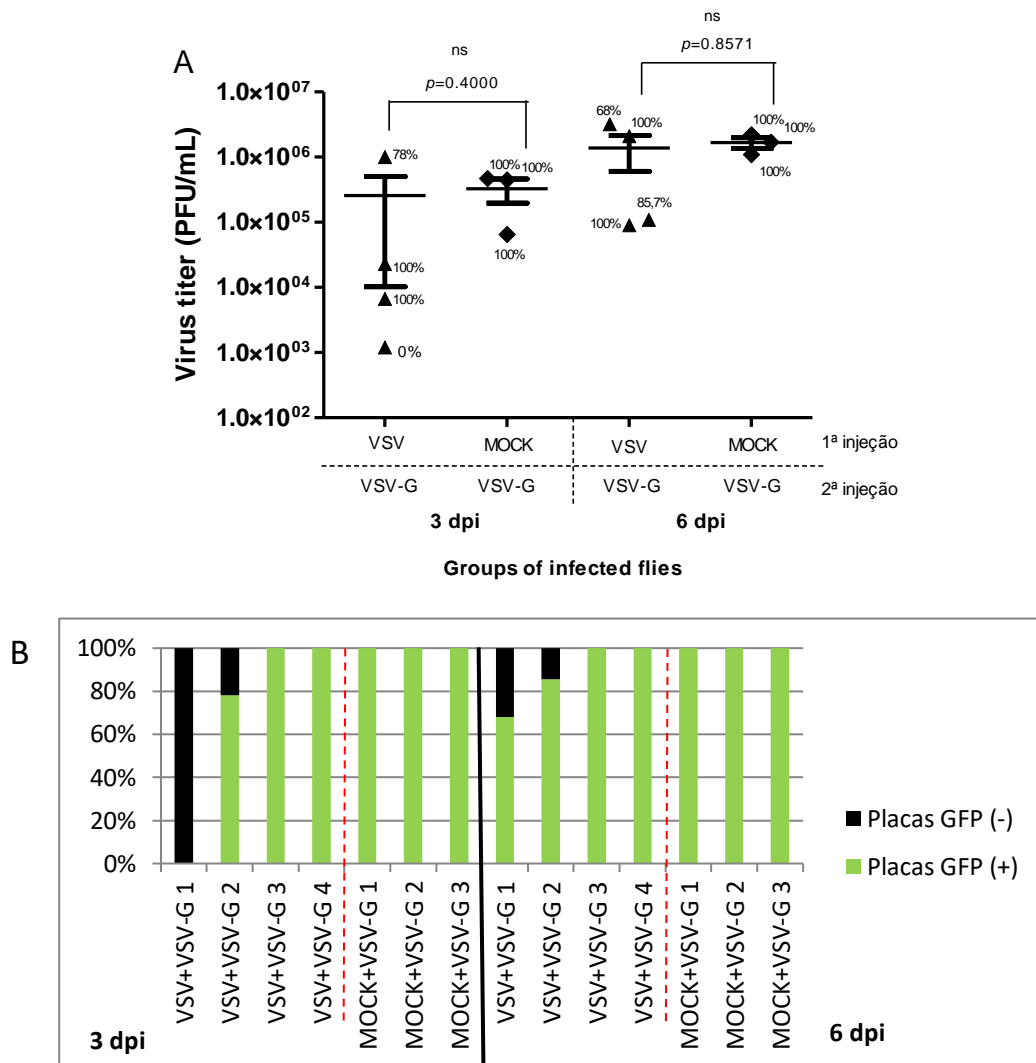


Figura 13 - Titulação de moscas selvagens infectadas com VSV e VSV-GFP. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV e quatro dias após esta injeção os mesmos indivíduos foram re-infectadas com 500 pfu de VSV-GFP. Dois tempos distintos de coletas foram estabelecidos: 3 e 6 dias. O grupo MOCK e VSV-GFP foi utilizado com controle do experimento. Após os tempos de 3 e 6 dias as moscas foram coletadas para a titulação viral, onde foi possível determinar a quantidade de unidades formadoras de placas por mosca (A) e a porcentagem de placas GFP positivas em cada indivíduo (B). A porcentagem acima de cada indivíduo que foi titulado representa a quantidade de placas GFP positivas relativa ao total de placas visualizadas (A). *ns* representa valores não significativos.

Durante uma infecção viral em células de *Drosophila*, muitos genes podem ser diferencialmente expressos em resposta a uma determinada infecção. Como exemplo deste fato, a infecção por DCV em moscas leva a indução de aproximadamente 130 genes (Dostert et al., 2005). Kemp e colaboradores observaram a indução de TotM em moscas infectadas com SINV, VSV e DXV (Kemp et al., 2013). Em nosso trabalho, escolhemos os genes TotM e CG11501, genes envolvidos com o estresse celular e sinalização após a infecção, para serem dosados em moscas infectadas com VSV e

VSV-G. Tot M pertence à família *Turandot* e é responsivo ao choque térmico e a infecções (Brun et al., 2006; Ekengren & Hultmark, 2001). O gene CG11501 codifica a proteína *diedel*, rica em cisteína, e está presente somente em drosofilídeos e em *Acyrtosiphon pisum*, uma hemíptera. Ambos os genes podem ser regulados pela via Jak-STAT ou pelo fator de transcrição Relish da família NF- κ B (Boutros et al., 2002; Brun et al., 2006; Coste et al., 2012). Após a dosagem da expressão destes genes, não observamos a diferença de expressão de Tot M e CG11501 entre os diferentes grupos de infecção, como mostrado na figura 14, apesar de Tot M ser mais expresso que o outro gene.

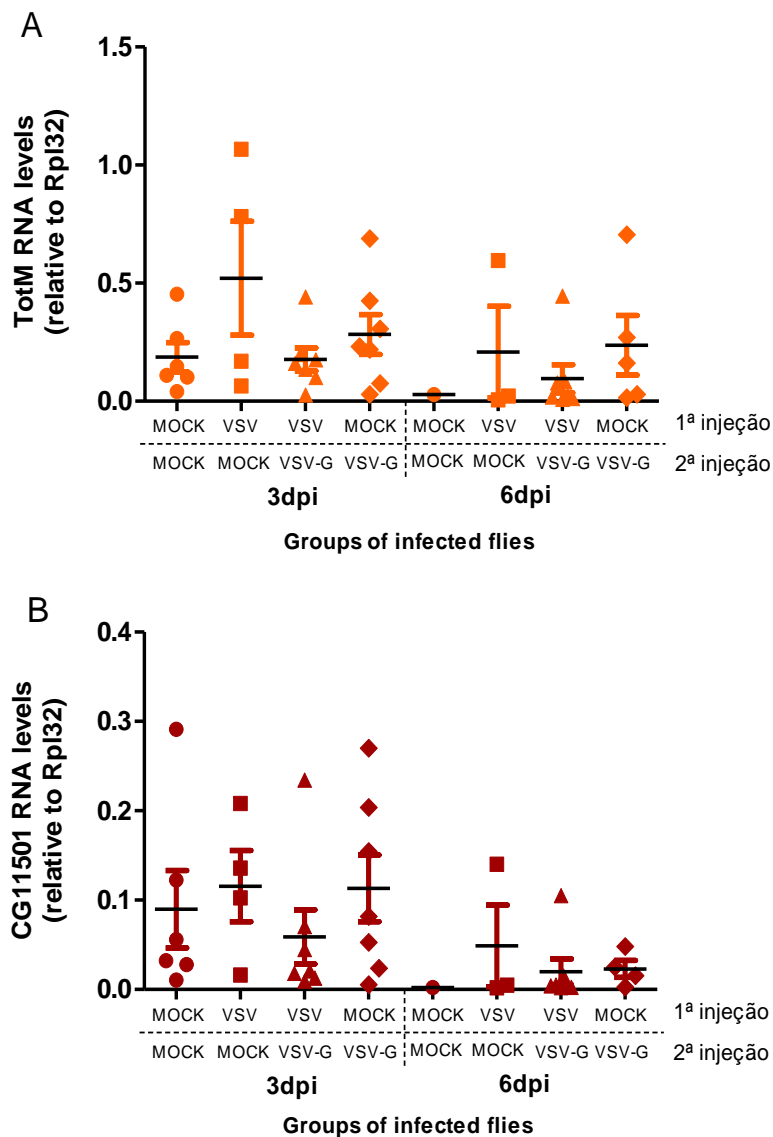


Figura 14 - Dosagem da expressão dos genes TotM e CG11501 em moscas infectadas com VSV e VSV-GFP. Os mesmos grupos de moscas infectadas com VSV e VSV-GFP após 3 e 6 dias infecção foram selecionados para a dosagem da expressão dos genes Tot M e CG11501. Os grupos controles

das infecções também foram submetidos a extração de RNA e processamento por qPCR. A dosagem da expressão de ambos os genes foi normalizada pelo gene constitutivo *Rp132*.

5.4 Infecções com VSV e VSV-GFP em moscas mutantes para via de siRNA

Com os resultados demonstrados anteriormente, definimos dois efeitos que interferem no progresso da segunda infecção em moscas previamente infectadas com um vírus homólogo: a dose viral e o tempo de infecção. A próxima etapa deste trabalho foi avaliar qual o mecanismo envolvido na interferência sobre a segunda infecção em moscas previamente expostas ao mesmo vírus.

Trabalhos de vários grupos incluindo o nosso, demonstraram que a infecção por VSV induz a ativação da via de RNAi em *Drosophila* pela produção de siRNAs virais provindos de intermediários da replicação de dupla fita de RNA do vírus (Marques et al., 2013; Mueller et al., 2010). Outros trabalhos demonstraram também a importância de algumas enzimas e proteínas da via durante a infecção por vários tipos de vírus, uma vez que moscas mutantes para Dcr-2 e Ago 2 apresentaram maior susceptibilidade à infecção viral (Galiana-Arnoux et al., 2006; Rij et al., 2006; Wang et al., 2006). Por se tratar do principal mecanismo antiviral em invertebrados, resolvemos avaliar o papel da via de RNAi durante a co-infecção, utilizando um genótipo de moscas mutantes para a via de siRNA.

Adotando a mesma estratégia dos experimentos anteriores que envolveram duas infecções em moscas selvagens, selecionamos moscas deficientes para Dcr-2 e R2D2 e infectamos com VSV e VSV-GFP. Mantivemos as doses de 5000 pfu do VSV selvagem para a primeira injeção e 500 pfu do VSV-GFP para a segunda injeção (figura 15). Optamos em utilizar três dias de infecção após a inoculação do segundo vírus (figura 15).

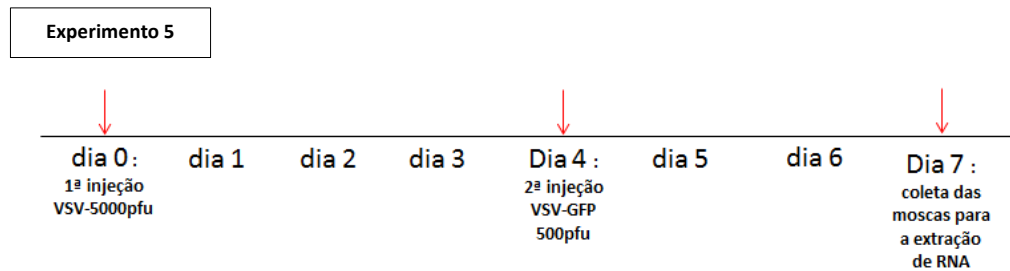


Figura 15 - Representação esquemática dos tempos de infecção e doses do VSV para a injeção em moscas mutantes para a via de RNAi. Moscas mutantes para Dicer-2 e R2D2 foram infectadas com 5000 pfu de VSV (dia 0). Quatro dias após a primeira injeção, os mesmos indivíduos foram infectados com 500 pfu de VSV-GFP (dia 4). Três dias após a segunda infecção todos os indivíduos foram coletados para a extração de RNA (dia 7). Os dias de infecção e o dia de coleta das moscas para a extração de RNA estão indicados com as setas.

Como demonstrado nas figuras 16A, houve a replicação do VSV nos indivíduos infectados e, como esperado, esta replicação foi maior nas moscas deficientes para a via de siRNA. Nas moscas controle, a expressão de GFP foi menor no grupo injetado com os dois vírus quando comparado ao grupo que foi somente infectado com o VSV-GFP (figura 16B). Ao analisarmos as moscas homozigotas para Dcr-2 e R2D2, deficientes para a via de siRNA, observamos também a diminuição da expressão de GFP no grupo que recebeu as duas infecções comparado ao grupo que recebeu somente o segundo vírus (figura 16B). Interessantemente, o *fold* de inibição sobre o segundo vírus foi 100 vezes maior em moscas deficientes para a via de RNAi comparado às moscas controle.

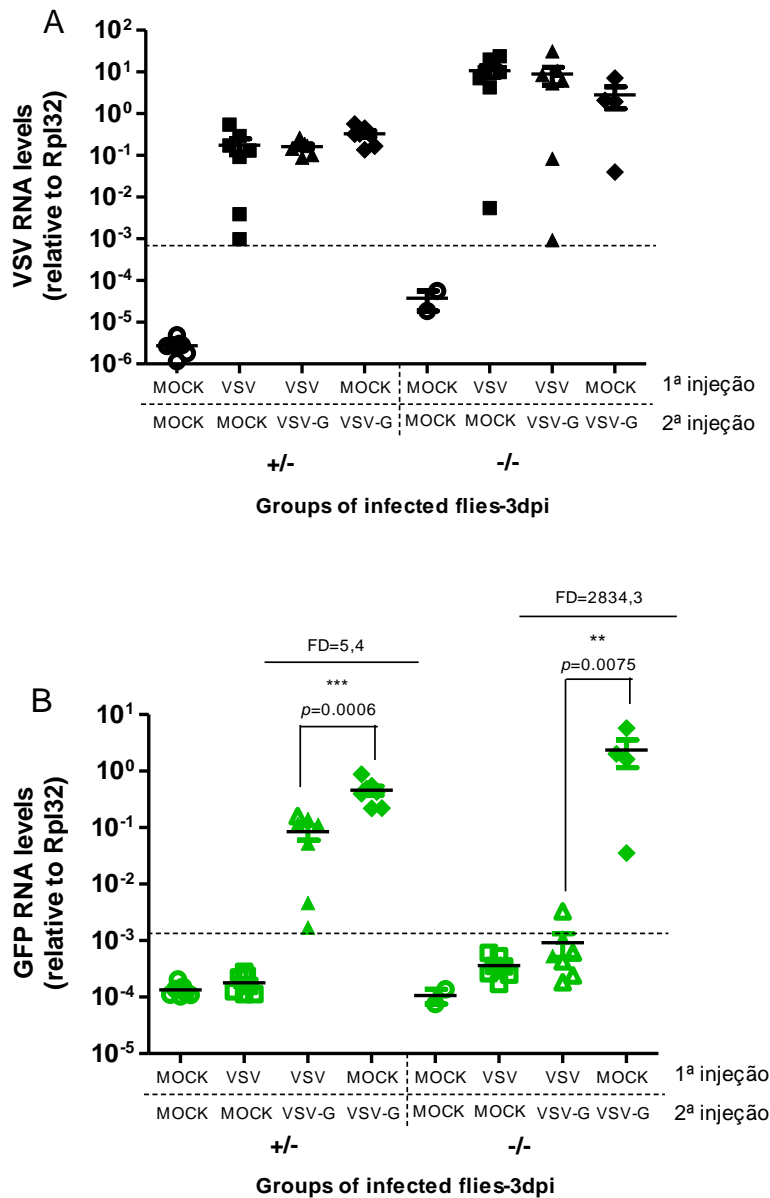


Figura 16 - Efeito da exposição prévia ao VSV na segunda infecção com VSV-GFP em moscas mutantes para a via de RNAi. Moscas mutantes homozigotas e heterozigotas para Dcr-2 e R2D2 com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV (primeira injeção) e após quatro dias foram re-infectadas com 500 pfu VSV-GFP (segunda injeção). Outros três grupos de moscas mutantes foram selecionados como controles do experimento: MOCK (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), VSV (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), MOCK (primeira injeção) e VSV-GFP (segunda injeção). Para todos os grupos foi feita a dosagem da carga viral (A) e a dosagem da expressão de GFP (B). Ambas as dosagens foram feitas por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo Rpl32. A linha pontilhada nas figuras A e B refere-se ao valor de limite de detecção do qPCR. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não foram infectados com VSV (A) e os indivíduos que não apresentaram sinal para GFP (B). A estes indivíduos foram atribuídos os valores do limite de detecção do qPCR para a realização da estatística. O valor de FD (*Fold difference*) representa a diferença de crescimento viral entre os grupos infectados com os dois vírus e os grupos infectados somente com o segundo vírus (B). $p < 0.05$ representam valores significativos e *ns* representam valores não significativos.

É importante acrescentar ainda, que apenas 28% das moscas homozigotas do grupo infectado com os dois vírus apresentaram sinal para GFP comparado a 100% das moscas controle (figura 17). Infecções paralelas a este experimento com moscas mutantes foram também realizadas, onde utilizamos mais dois tempos distintos de infecção após a injeção do segundo vírus. Como mostrado na figura 17, a redução do sinal para GFP acompanha a diminuição do tempo de infecção e esta redução é mais expressiva no grupo de moscas deficientes para a via de siRNA.

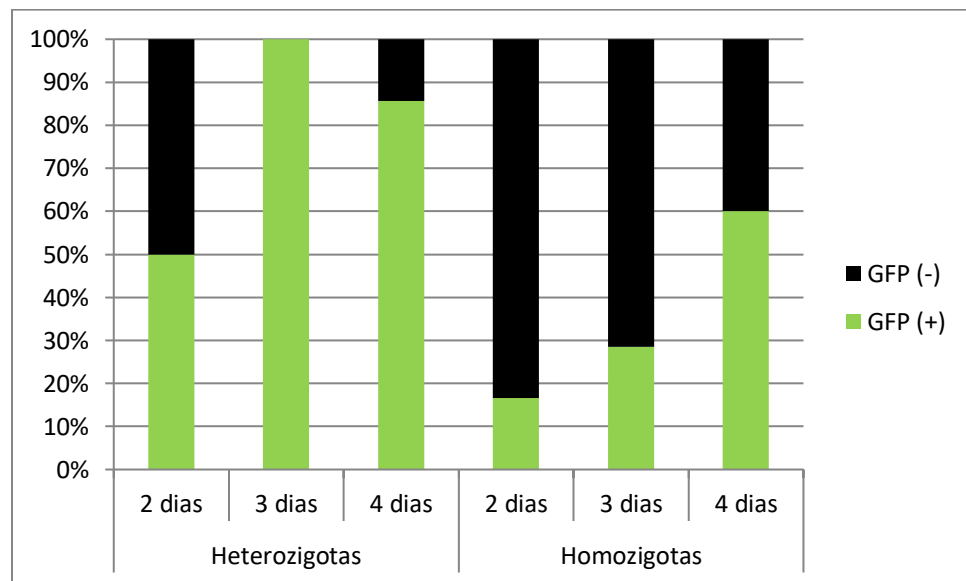


Figura 17 - Porcentagem de moscas mutantes para a via de siRNA infectadas com VSV e VSV-G que expressaram GFP. Moscas mutantes para Dcr-2 e R2D2 foram infectadas com VSV e após quatro dias de infecção foram re-infectadas com VSV-GFP. Três tempos distintos de infecção após a injeção do segundo vírus foram estabelecidos: 2, 3 e 4 dias. A porcentagem se refere ao número de moscas infectadas com os dois vírus que apresentaram sinal para GFP (GFP+) sobre o número total de moscas infectadas com ambos os vírus.

Como produção de siRNAs constitui a principal resposta antiviral em insetos, esperávamos a sua participação no modelo co-infecção. Entretanto, os resultados com moscas mutantes para via de RNAi sugerem a presença de um mecanismo de interferência sobre a segunda infecção em moscas previamente expostas ao VSV independente de tal via. Outra observação é que o fenômeno de interferência sobre o segundo vírus foi mais expressivo nas moscas deficientes para Dcr-2 e R2D2 comparado aos mesmos grupos infectados com VSV e VSV-G do grupo controle. Neste contexto, poderíamos sugerir que haja o aumento da ativação de outras vias de imunidade inata em moscas co-infectadas para compensar a deficiência da produção de siRNAs. Como os genes Tot M e CG11501 podem ser regulados pelas vias JaK-

STAT e Imd dosamos as suas expressões com a finalidade de analisar a possível participação de outras vias de imunidade nos grupos de moscas mutantes infectadas com os dois vírus. Observamos que apesar da maior expressão de TotM em todos os grupos de infecção, não houve diferença da expressão de ambos os genes entre os mesmos grupos de infecção (figura 18).

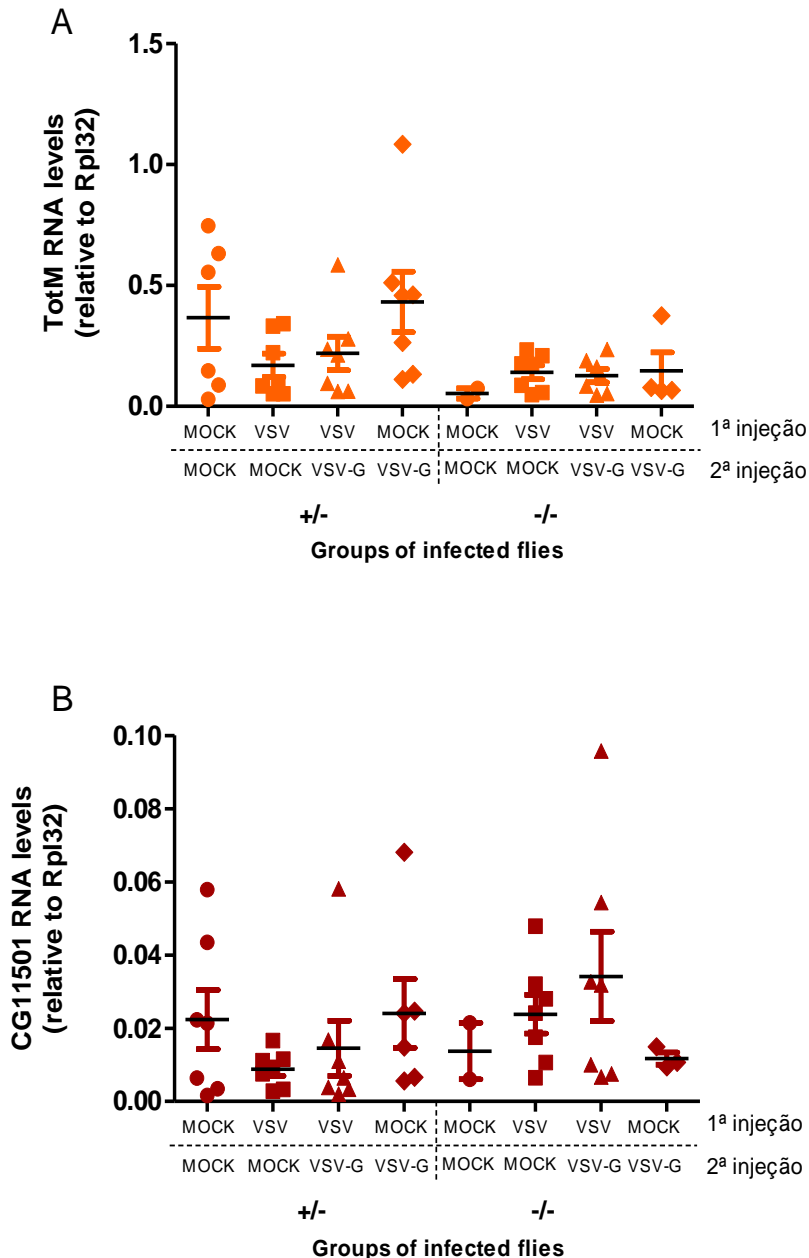


Figura 18 - Dosagem da expressão dos genes TotM e CG501 em moscas mutantes para Dcr-2 e R2D2 infectadas com VSV e VSV-GFP. Os mesmos grupos de moscas mutantes infectadas com VSV e VSV-GFP após 3 e 6 dias infecção foram seleccionados para a dosagem da expressão dos genes Tot M e CG11501. Os grupos controles das infecções também foram submetidos a extração de RNA e processamento por qPCR. A dosagem da expressão de ambos os genes foi normalizada pelo gene constitutivo *Rpl32*.

Além da possível ativação de outras vias de imunidade inata que devem ser avaliadas posteriormente, podemos sugerir a existência de uma interferência direta por competição do primeiro vírus sobre o segundo que seria mais pronunciada em moscas mutantes. Como tal via não é funcional nestes indivíduos, ao infectá-los com VSV, o vírus se replica mais, comprometendo a eficiente multiplicação do segundo vírus nos mesmos indivíduos infectados.

A competição viral provavelmente ocorre entre vírus iguais ou de estratégia similar por apresentarem os mesmos alvos celulares. Desta forma, torna-se importante avaliarmos a existência do efeito de interferência sobre a segunda infecção utilizando um vírus heterólogo na exposição secundária. Além do mais, o uso de dois vírus distintos permite avaliar se o mecanismo de interferência seria específico ao mesmo vírus.

5.5 Cinética de replicação viral e dose resposta do SINV

Para as infecções utilizando um vírus heterólogo na segunda injeção, escolhemos o SINV e anteriormente às infecções duplas, realizamos uma cinética de multiplicação viral e dose resposta deste vírus. Para este experimento, infectamos moscas selvagens com três diferentes doses do SINV e determinamos dois tempos distintos de infecção. Assim como foi feito para o VSV, este experimento teve como finalidade avaliar as melhores condições de multiplicação do SINV para serem utilizadas nos próximos experimentos de co-infecção.

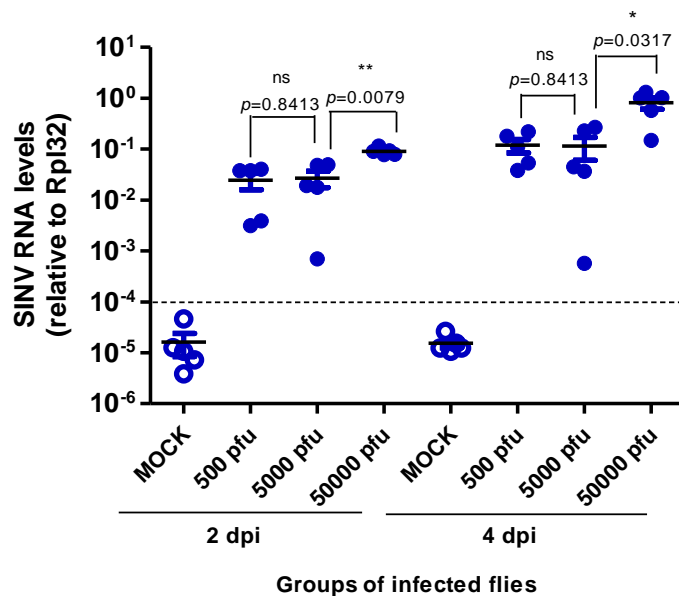


Figura 19 - Cinética de replicação viral após a injeção de diferentes doses do SINV em moscas adultas. Três grupos de moscas selvagens, da linhagem *Canton S*, foram infectados separadamente por injeção intratorácica com 50, 500 e 5000 pfu de SINV. Após os tempos de 2 e 4 dias de infecção, todas as moscas foram coletadas individualmente para a extração de RNA e processamento por RT-qPCR. Os níveis de RNA viral foram normalizados pela expressão do gene endógeno *Rpl32*. Os símbolos fechados representam os indivíduos infectados e os símbolos abertos, os indivíduos não infectados. $p < 0.005$ representam valores significativos e *ns* valores não significativos.

Podemos observar no gráfico acima, o crescimento do SINV nos grupos de moscas infectadas com as três doses escolhidas e em ambos os tempos de infecção (figura 20). Apesar da diferença significativa da carga viral entre os indivíduos infectados com 5000 pfu e 50000 pfu, optamos em utilizar 500 pfu como dose para a segunda infecção nos próximos experimentos, por ser a mesma dose utilizada nas infecções com VSV-GFP e por não se tratar de uma dose saturante.

5.6 Infecção em moscas selvagens com VSV e SINV

A próxima etapa deste trabalho foi avaliar se o efeito de interferência contra uma infecção secundária também ocorre em moscas infectadas com um vírus diferente da infecção primária. Então, selecionamos um grupo de moscas selvagens, infectamos com VSV e após quatro dias de infecção, inoculamos nas mesmas moscas o SINV. Além da dose de 500 pfu do SINV, definimos ainda dois tempos distintos de infecção após a injeção do segundo vírus. As condições de infecção estão representadas na figura 21.

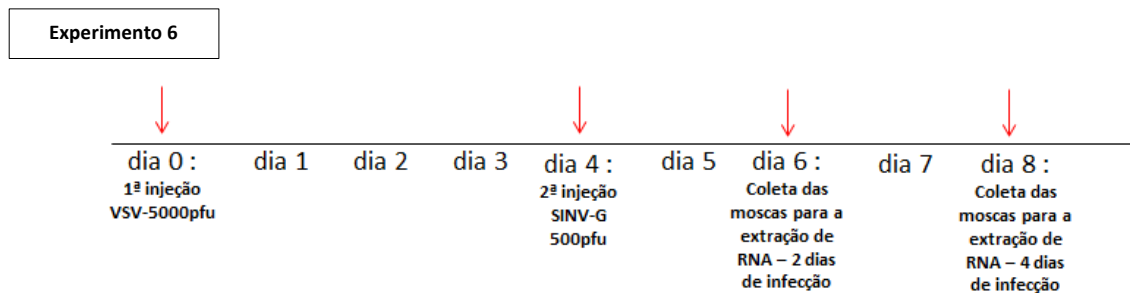


Figura 20 - Representação esquemática dos tempos de infecção e dose do VSV e SINV para a injeção em moscas adultas do experimento 6. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram infectadas no dia 0 com 5000 pfu de VSV. Quatro dias após a primeira infecção as mesmas moscas foram re-infectadas com 500 pfu de SINV (dia 4). Dois tempos para a coleta das moscas foram estabelecidos: 2 dias após a segunda infecção (dia 6) e 4 dias após a segunda infecção (dia 8). Os dias de infecção e os dias de coleta das moscas para a extração de RNA estão indicados com as setas.

Ao quantificarmos os níveis de RNA mensageiro do primeiro vírus, observamos que houve a replicação do VSV nos grupos de moscas infectadas previamente com este vírus (figura 22A). A dosagem da carga viral no grupo de moscas infectadas com SINV nos revela uma diferença significativa entre os grupos infectados com os dois vírus e os grupos controles, dos quais foram inoculados somente com SINV, em ambos os tempos de infecção (figura 22B). Observamos ainda que o *fold* de inibição no grupo infectado com VSV e SINV parece aumentar com o tempo de infecção, diferentemente dos grupos de moscas infectadas com VSV-G na segunda injeção. Este resultado nos revela a existência do mecanismo de interferência sobre a segunda infecção em moscas inoculadas previamente com um vírus distinto do que foi utilizado

na segunda infecção. Portanto, o efeito de interferência não é específico ao mesmo vírus em moscas co-infectadas.

Os resultados acima reforçam a ideia de que o mecanismo de interferência observada não é dependente da via de RNAi já que os pequenos RNAs virais produzidos durante uma infecção em células de insetos são específicos a cada vírus. Neste caso, estaríamos relacionando o fenômeno de interferência viral em moscas co-infectadas a uma resposta do hospedeiro. Mas não devemos descartar a hipótese de que este fenômeno pode ser uma resposta do vírus. Apesar do vírus da infecção primária ser diferente da utilizada na secundária, ainda assim pode ter ocorrido uma competição entre os dois vírus distintos ocasionando a interferência sobre o progresso da segunda infecção.

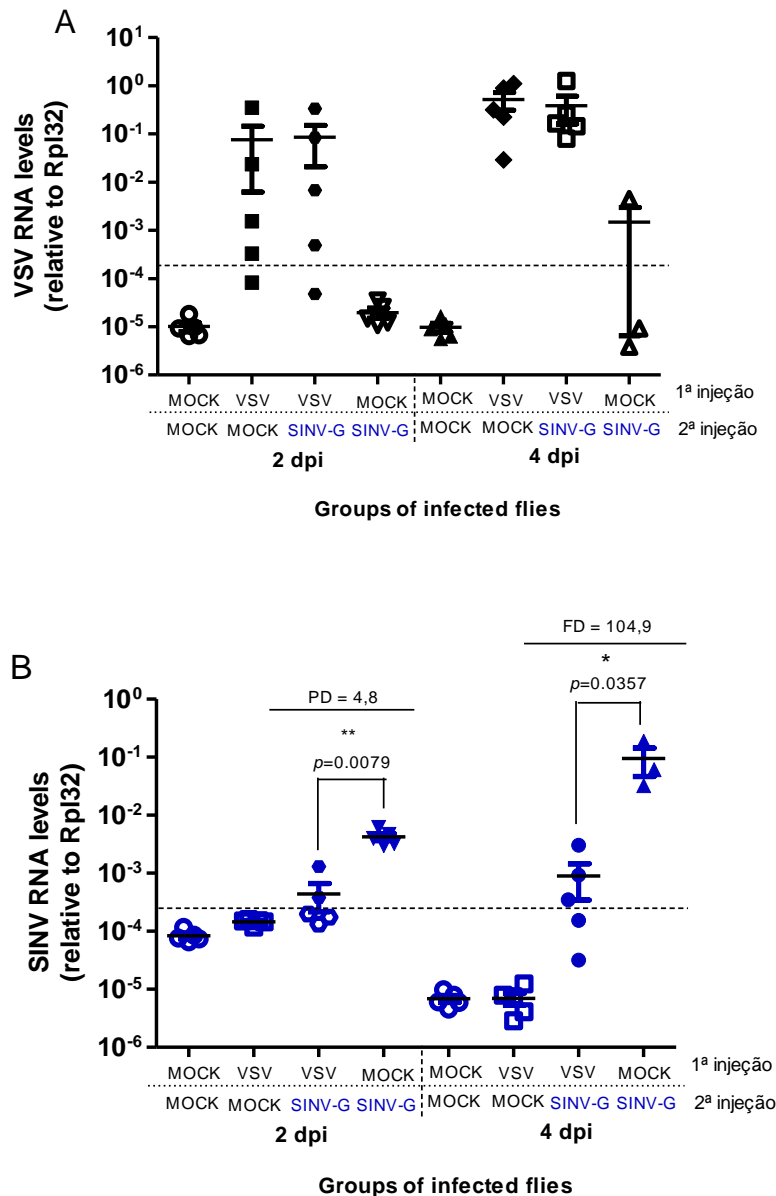


Figura 21 - Efeito da infecção prévia com VSV em moscas selvagens infectadas com SINV. Moscas selvagens com idade entre 2 e 5 dias foram infectadas com 5000 pfu de VSV (primeira injeção) e após quatro dias foram re-infectadas com 500 pfu SINV (segunda injeção). Outros três grupos de moscas selvagens foram seleccionados como controles do experimento: MOCK (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), VSV (primeira injeção) e MOCK (segunda injeção), MOCK (primeira injeção) e SINV (segunda injeção). Dois dias após a segunda injeção, foi feita a primeira coleta das moscas e quatro dias após a segunda injeção foi feita a segunda coleta de moscas. Para todos os grupos foi feita a dosagem nos níveis de RNA mensageiro do VSV (A) e dosagem dos níveis de RNA mensageiro do SINV (B). Ambas as dosagens foram feitas por RT-qPCR e normalizadas pelo gene constitutivo Rpl32. A linha pontilhada nas figuras A e B refere-se ao valor de limite de detecção do qPCR. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não foram infectados com VSV (A) ou indivíduos que não foram infectados com SINV (B). O valor de FD (*Fold difference*) representa a diferença de crescimento viral do SINV entre o grupo infectado com os dois vírus e o grupo infectado somente com o segundo vírus (B). $p < 0.005$ representam valores significativos e *ns* valores não significativos.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho desenvolveu um modelo em *Drosophila* para avaliar o contexto de co-infecção viral em insetos utilizando vírus homólogos ou heterólogos. Neste modelo, nós demonstramos a existência de um mecanismo ativado em moscas previamente infectadas por um vírus que interfere sobre a progressão da uma segunda infecção por vírus homólogos ou heterólogos. O aumento da dose do segundo vírus ou a análise de sua replicação em tempos mais tardios de infecção levam a uma diminuição da interferência observada sugerindo que o fenômeno descrito acima seja saturável. Apesar do nosso trabalho não ter ainda caracterizado o mecanismo de interferência, nossos resultados podem ser analisados em comparação a outros trabalhos na literatura.

Um trabalho, realizado por Langdon e colaboradores (2013), observou que a infecção com uma dose sub-letal do DCV não era capaz de proteger moscas de uma subsequente exposição a uma dose letal do mesmo vírus. Entretanto, somente a sobrevivência do hospedeiro foi avaliada e não a replicação do vírus. Como a sobrevivência é uma medida extrema de comparação, é possível que tenha havido diferença na replicação viral mesmo que esta diferença não tenha se refletido na sobrevivência.

Outros trabalhos avaliaram o efeito de uma infecção prévia por patógenos não virais na susceptibilidade do inseto quando exposto a uma segunda infecção pelo mesmo patógeno. Pham e colaboradores (2007) demonstraram a existência de um possível efeito protetor em moscas infectadas previamente com *Streptococcus pneumoniae* contra a segunda exposição pela mesma bactéria. Características da imunidade adaptativa de vertebrados, como especificidade e memória, foram relacionadas a este possível mecanismo de proteção, chamado de *immune priming*. Em contraste, o nosso trabalho sugere que o efeito de interferência induzido pela primagem com um vírus, não é específico para vírus homólogos. Ao utilizarmos o SINV na segunda injeção, nós observamos que o fenômeno de interferência sobre o progresso da infecção secundária também atua sobre um vírus diferente do utilizado na infecção primária (figura 21B). Portanto, o fenômeno de interferência descrito aqui, não tem a mesma especificidade da primagem descrita por Pham e colaboradores (2007), embora nós precisemos fazer outros experimentos para determinar o quão geral seria a resposta observada por nós.

Os resultados obtidos utilizando moscas mutantes para a via de RNAi reforçou a ideia de que, possivelmente não haja especificidade da resposta contra uma segunda exposição viral, em moscas previamente infectas. O objetivo de avaliar o papel desta via no contexto de co-infecção foi baseado na hipótese que a produção de siRNAs durante uma infecção primária poderiam agir contra um vírus homólogo em uma infecção secundária. Entretanto, o fenômeno de interferência sobre a progressão da segunda infecção também foi mostrado em moscas deficientes para Dcr-2 e R2D2 (figura 16B). Assim, apesar da via de RNAi ser considerada a principal resposta antiviral em insetos, ela não parece estar envolvida no efeito de interferência observado por nós. Caso a via estivesse envolvida, possivelmente nós não visualizaríamos o efeito de interferência em moscas mutantes. Além do mais, se houvesse a participação da via de RNAi, esperaríamos que o efeito de interferência fosse vírus-específico uma vez que os siRNAs antivirais são específicos para cada vírus e portanto, não agiriam contra um vírus heterólogo.

Saleh e colaboradores (2009) observaram que a introdução de um dsRNA correspondente a uma sequência do SINV em moscas selvagens protegia estas moscas contra a infecção pelo mesmo vírus de uma maneira dependente da via de RNAi. É importante pontuar que neste trabalho, foi utilizado um dsRNA na primeira injeção e não o vírus como em nosso estudo. É possível que enquanto o vírus possa ativar outras vias de imunidade em *Drosophila*, o dsRNA provavelmente será um melhor ativador para a via de RNAi. Além disto, a via de siRNAs ativada pela infecção viral é diferente da via induzida por dsRNA exógeno (Marques et al., 2013; Marques et al., 2010), o que poderia explicar os resultados opostos quando as moscas são expostas ao dsRNA ou ao vírus.

Interessantemente, o fenômeno de interferência mostrou uma tendência a ser maior em moscas mutantes para a via de RNAi o que poderia sugerir que, na sua ausência, poderia haver compensação na ativação de outras vias antivirais. Para avaliar a participação destas vias é essencial que moscas deficientes para imunidade inata, como *Toll* e *Imd*, sejam avaliadas. Nós dosamos a expressão dos genes *TotM* e *CG11501*, que podem ser regulados pelas vias de JaK-STAT e *Imd*, para analisar indiretamente a participação de outras vias de imunidade inata. A expressão de ambos os genes não foi significativamente diferente nos grupos de moscas mutantes infectadas com VSV (figuras 18A e 18B). A expressão destes genes também não foi

diferente entre moscas selvagens (figuras 14A e 14B). Entretanto, devemos considerar que TotM e CG11501 são genes de resposta precoce, expressos em menos de 24 horas após a infecção e os tempos analisados em nosso trabalho foram de no mínimo 48 horas de infecção.

Todas as observações acima foram feitas considerando que o fenômeno de interferência sobre a multiplicação do segundo vírus seria consequência de uma resposta do hospedeiro. Neste cenário, quando o primeiro vírus infecta a mosca, haveria produção de moléculas efetoras que agiriam contra a segunda infecção. Alternativamente, a interferência que observamos sobre a segunda infecção poderia ser explicada por competição direta entre o primeiro e o segundo vírus. É possível que o número de células 'infectáveis' ou, de forma mais geral, a disponibilidade de recursos dentro do inseto seja limitada de forma que a saturação dos recursos pelo primeiro vírus comprometeria a capacidade de replicação do segundo. Esta hipótese pode ajudar a explicar o fato da interferência observada em moscas mutantes para a via de RNAi ser maior que em moscas selvagens. Nas moscas deficientes para Dcr-2 e R2D2 há uma maior replicação do primeiro vírus de forma a saturar o limite de infecção destes animais mais rapidamente e eficientemente que em moscas selvagens. Entretanto, o fato de a interferência agir sobre um vírus diferente sugere que ele não é mediado por competição direta já que dois vírus diferentes como SINV e VSV provavelmente não competiriam pelos mesmos recursos no hospedeiro e não teriam como alvo as mesmas células.

Muitos estudos foram desenvolvidos sobre a imunidade antiviral em insetos, sugerindo a ausência de características comumente associadas à imunidade adaptativa de vertebrados. Nosso trabalho demonstrou a existência de um fenômeno de interferência sobre uma infecção secundária em moscas infectadas com o mesmo vírus ou vírus distintos. Mas muitas questões ainda permanecem desconhecidas, como se este efeito é mediado por fatores solúveis ou por células presentes na hemolinfa ou até mesmo se poderia ser transmitido verticalmente. Trabalhos posteriores devem ser realizados a fim de elucidar se este efeito seria uma resposta gerada pelo primeiro vírus ou uma resposta imune produzida pela *Drosophila*. Assim, poderíamos avaliar melhor o impacto deste efeito de interferência observado em nosso trabalho sobre a transmissão dos arbovírus por insetos vetores.

7. CONCLUSÕES

- O modelo de infecção com dois vírus em *Drosophila* foi estabelecido com sucesso;
- Neste modelo, nós caracterizamos um efeito de interferência de uma infecção primária sobre a replicação de um vírus homólogo ou heterólogo em uma segunda infecção;
- A interferência sobre uma infecção secundária é um mecanismo saturável, dependente do tempo de infecção e da dose viral;
- O efeito de interferência foi observado em moscas deficientes para via de RNAi, sugerindo que este efeito não é dependente de tal via, apesar da sua participação no controle da infecção por VSV;
- O mesmo efeito de interferência foi também observado em moscas infectadas com dois vírus distintos (VSV e SINV) e, portanto, não é específico a um vírus e independente da via de RNAi;

8. PERSPECTIVAS

- Utilizar outros tipos de vírus, como vírus de DNA ou patógenos diferentes, como bactéria, na segunda infecção para avaliar melhor o efeito de interferência nas moscas infectadas com patógenos cada vez mais diferentes ao da infecção primária;
- Utilizar um vírus inativado na primeira infecção para avaliar se o efeito de interferência do primeiro vírus é dependente da replicação viral;
- Utilizar diferentes doses do primeiro vírus para melhor avaliar a saturação do efeito de interferência;
- Utilizar moscas mutantes para as vias de *Toll*, *Imd*, *Jak-STAT* e autofagia para avaliar a participação de tais vias no mecanismo de interferência;
- Avaliar outros aspectos da infecção secundária como a sobrevivência de moscas infectadas;
- Avaliar se o efeito de interferência sobre a segunda infecção é transmissível para a prole.

9. REFERÊNCIAS

- Agaisse, H., & Perrimon, N. (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological reviews*, 198, 72–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199955>
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., & Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Developmental cell*, 5(3), 441–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967563>
- Avadhanula, V., Weasner, B. P., Hardy, G. G., Kumar, J. P., & Hardy, R. W. (2009). A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS pathogens*, 5(9), e1000582. doi:10.1371/journal.ppat.1000582
- Bartel, D. P., Lee, R., & Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes*, 116, 281–297.
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature reviews. Genetics*, 6(1), 9–23. doi:10.1038/nrg1503
- Bier, E., & Guichard, A. (2012). Deconstructing host-pathogen interactions in *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 5(1), 48–61. doi:10.1242/dmm.000406
- Boutros, M., Agaisse, H., & Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell*, 3(5), 711–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431377>
- Brennecke, J., Aravin, A. a, Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), 1089–103. doi:10.1016/j.cell.2007.01.043
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Vodovar, N., Ince, I. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M.-C., et al. (2012). The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), E3604–13. doi:10.1073/pnas.1207213109
- Brun, S., Vidal, S., Spellman, P., Takahashi, K., Tricoire, H., & Lemaitre, B. (2006). The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 11(4), 397–407. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00953.x
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–55. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035

- Charrel, R. N., Ph, D., Lamballerie, X. D., & Raoult, D. (2007). Chikungunya Outbreaks — The Globalization, 769–771.
- Cirimotich, C. M., Scott, J. C., Phillips, A. T., Geiss, B. J., & Olson, K. E. (2009). Suppression of RNA interference increases alphavirus replication and virus-associated mortality in *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, *9*, 49. doi:10.1186/1471-2180-9-49
- Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., & Schneider, D. (2009). The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS one*, *4*(10), e7436. doi:10.1371/journal.pone.0007436
- Coste, F., Kemp, C., Bobezeau, V., Hetru, C., Kellenberger, C., Imler, J.-L., & Roussel, A. (2012). Crystal structure of Dieder, a marker of the immune response of *Drosophila melanogaster*. *PLoS one*, *7*(3), e33416. doi:10.1371/journal.pone.0033416
- Deretic, V., & Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe*, *5*(6), 527–49. doi:10.1016/j.chom.2009.05.016
- Ding, S.-W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature reviews. Immunology*, *10*(9), 632–44. doi:10.1038/nri2824
- Ding, S.-W., & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, *130*(3), 413–26. doi:10.1016/j.cell.2007.07.039
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J. a, et al. (2005a). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature immunology*, *6*(9), 946–53. doi:10.1038/ni1237
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J. a, et al. (2005b). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature immunology*, *6*(9), 946–53. doi:10.1038/ni1237
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., et al. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature genetics*, *33*(3), 388–91. doi:10.1038/ng1097
- Ekengren, S., & Hultmark, D. (2001). A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochemical and biophysical research communications*, *284*(4), 998–1003. doi:10.1006/bbrc.2001.5067
- Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science (New York, N.Y.)*, *301*(5639), 1545–7. doi:10.1126/science.1087117

- Ferrandon, D., Imler, J.-L., Hetru, C., & Hoffmann, J. a. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature reviews. Immunology*, *7*(11), 862–74. doi:10.1038/nri2194
- Fire, a, Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. a, Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806–11. doi:10.1038/35888
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. a, & Imler, J.-L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *drosophila*. *Nature immunology*, *7*(6), 590–7. doi:10.1038/ni1335
- Grimes, W.J., Burge, B.W. (1971). Modification of Sindbis Virus Glycoprotein by Modification of Sin dbis Virus Glycoprotein by Host-Specified Glycosyl Transferases.
- Goic, B., Vodovar, N., Mondotte, J. a, Monot, C., Frangeul, L., Blanc, H., Gausson, V., et al. (2013). RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nature immunology*, *14*(4), 396–403. doi:10.1038/ni.2542
- Gubler, D. J. (1998). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging infectious diseases*, *4*(3), 442–50. doi:10.3201/eid0403.980326
- Hamilton, a. J. (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*, *286*(5441), 950–952. doi:10.1126/science.286.5441.950
- Ho, L.-J., Hung, L.-F., Weng, C.-Y., Wu, W.-L., Chou, P., Lin, Y.-L., Chang, D.-M., et al. (2005). Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(12), 8163–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944325>
- Hoffmann, J. a, & Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*, *3*(2), 121–6. doi:10.1038/ni0202-121
- Huang, Z., Kingsolver, M. B., Avadhanula, V., & Hardy, R. W. (2013). An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. *Journal of virology*, *87*(8), 4272–80. doi:10.1128/JVI.03360-12
- Jin, M. S., & Lee, J.-O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, *29*(2), 182–91. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.007
- Kanthong, N., Khemnu, N., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P., & Flegel, T. W. (2010). Persistent, triple-virus co-infections in mosquito cells. *BMC microbiology*, *10*, 14. doi:10.1186/1471-2180-10-14

- Kanthong, N., Khemnu, N., Sriurairatana, S., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P., & Flegel, T. W. (2008). Mosquito cells accommodate balanced, persistent co-infections with a densovirus and Dengue virus. *Developmental and comparative immunology*, 32(9), 1063–75. doi:10.1016/j.dci.2008.02.008
- Keene, K. M., Foy, B. D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B. J., Blair, C. D., & Olson, K. E. (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17240–5. doi:10.1073/pnas.0406983101
- Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., et al. (2013). Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in *Drosophila*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(2), 650–8. doi:10.4049/jimmunol.1102486
- Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7), 1017–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875855>
- Khoo, C. C. H., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Franz, A. W. E. (2010). The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC microbiology*, 10, 130. doi:10.1186/1471-2180-10-130
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1), 69–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066283>
- Li, H., Li, W. X., & Ding, S. W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5571), 1319–21. doi:10.1126/science.1070948
- Little, T., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. (2003). Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Current Biology*, 13(Figure 1), 489–492. doi:10.1016/S
- Longdon, B., Cao, C., Martinez, J., & Jiggins, F. M. (2013). Previous Exposure to an RNA Virus Does Not Protect against Subsequent Infection in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 8(9), e73833. doi:10.1371/journal.pone.0073833
- Ma, M., Huang, Y., Gong, Z., Zhuang, L., Li, C., Yang, H., Tong, Y., et al. (2011). Discovery of DNA viruses in wild-caught mosquitoes using small RNA high throughput sequencing. *PloS one*, 6(9), e24758. doi:10.1371/journal.pone.0024758

- Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., & Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*, *10*(12 Suppl), S98–109. doi:10.1038/nm1144
- Maillard, P. V., Ciaudo, C., Marchais, a, Li, Y., Jay, F., Ding, S. W., & Voinnet, O. (2013). Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science (New York, N. Y.)*, *342*(6155), 235–8. doi:10.1126/science.1241930
- March, B., Ocean, I., & January, F. (2006). Chikungunya Disease Outbreak , Reunion Island Assay to Detect H5N1 Oseltamivir Resistance, *12*(12), 2005–2006.
- Marques, Joao Trindade, Wang, J.-P., Wang, X., de Oliveira, K. P. V., Gao, C., Aguiar, E. R. G. R., Jafari, N., et al. (2013). Functional specialization of the small interfering RNA pathway in response to virus infection. *PLoS pathogens*, *9*(8), e1003579. doi:10.1371/journal.ppat.1003579
- Marques, João Trindade, Kim, K., Wu, P.-H., Alleyne, T. M., Jafari, N., & Carthew, R. W. (2010). Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nature structural & molecular biology*, *17*(1), 24–30. doi:10.1038/nsmb.1735
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, *123*(4), 607–20. doi:10.1016/j.cell.2005.08.044
- Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2012). Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS pathogens*, *8*(1), e1002470. doi:10.1371/journal.ppat.1002470
- Mudd, J. a, Leavitt, R. W., Kingsbury, D. T., & Holland, J. J. (1973). Natural selection of mutants of vesicular stomatitis virus by cultured cells of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of general virology*, *20*(3), 341–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355329>
- Mueller, S., Gausson, V., Vodovar, N., Deddouche, S., Troxler, L., & Perot, J. (2010). RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. doi:10.1073/pnas.1014378107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1014378107
- Myles, K. M., Wiley, M. R., Morazzani, E. M., & Adelman, Z. N. (2008). Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19938–43. doi:10.1073/pnas.0803408105
- Naitza, S., & Ligoxygakis, P. (2004). Erratum to “Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far” [Mol Immunol 40 (2004) 887–896]. *Molecular Immunology*, *41*(5), 563. doi:10.1016/j.molimm.2004.04.003

- Nakamoto, M., Moy, R. H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S. S., Gold, B., et al. (2012). Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity*, *36*(4), 658–67. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.003
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS pathogens*, *3*(3), e26. doi:10.1371/journal.ppat.0030026
- Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene* **27**: 493–497.
- Rij, R. van, Saleh, M., & Berry, B. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & ...*, 2985–2995. doi:10.1101/gad.1482006.plementary
- Rodriguez-Andres, J., Rani, S., Varjak, M., Chase-Topping, M. E., Beck, M. H., Ferguson, M. C., Schnettler, E., et al. (2012). Phenoloxidase activity acts as a mosquito innate immune response against infection with Semliki Forest virus. *PLoS pathogens*, *8*(11), e1002977. doi:10.1371/journal.ppat.1002977
- Roignant, J., Carré, C., & Mugat, B. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila*, 299–308. doi:10.1261/rna.2154103.gene
- Roth, O., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2009). Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *276*(1654), 145–51. doi:10.1098/rspb.2008.1157
- Sabin, L. R., Hanna, S. L., & Cherry, S. (2010). Innate antiviral immunity in *Drosophila*. *Current opinion in immunology*, *22*(1), 4–9. doi:10.1016/j.coi.2010.01.007
- Saleh, M.-C., Tassetto, M., van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., et al. (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, *458*(7236), 346–50. doi:10.1038/nature07712
- Saleh, M.-C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology*, *8*(8), 793–802. doi:10.1038/ncb1439
- Schneider, D. (2000). Malaria Parasite Development in a *Drosophila* Model. *Science*, *288*(5475), 2376–2379. doi:10.1126/science.288.5475.2376
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., & Cherry, S. (2009). Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity*, *30*(4), 588–98. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.009

- Sioud, M. (2010). Recent advances in small interfering RNA sensing by the immune system. *New biotechnology*, 27(3), 236–42. doi:10.1016/j.nbt.2010.02.015
- Souza-Neto, J. a, Sim, S., & Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17841–6. doi:10.1073/pnas.0905006106
- Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 58(3), 491–562. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372977&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tanji, T., & Ip, Y. T. (2005). Regulators of the Toll and Imd pathways in the Drosophila innate immune response. *Trends in immunology*, 26(4), 193–8. doi:10.1016/j.it.2005.02.006
- Tijsterman, M., May, R. C., Simmer, F., Okihara, K. L., & Plasterk, R. H. a. (2004). Genes Required for Systemic RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 14(2), 111–116. doi:10.1016/j.cub.2003.12.029
- Timmons, L., Tabara, H., Mello, C. C., & Fire, A. Z. (2003). Inducible Systemic RNA Silencing in *Caenorhabditis elegans*, 14(July), 2972–2983. doi:10.1091/mbc.E03
- Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R. A., Kocks, C., & Rämetsä, M. (2006). Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(20), 14370–5. doi:10.1074/jbc.M513868200
- Vodovar, N., Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R. P., & Saleh, M.-C. (2012). Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *PloS one*, 7(1), e30861. doi:10.1371/journal.pone.0030861
- Wang, L., & Ligoxygakis, P. (2006). Pathogen recognition and signalling in the *Drosophila* innate immune response. *Immunobiology*, 211(4), 251–61. doi:10.1016/j.imbio.2006.01.001
- Wang, X.-H., Aliyari, R., Li, W.-X., Li, H.-W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., et al. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 452–4. doi:10.1126/science.1125694
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13959–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Wianny, F., & Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature cell biology*, 2(2), 70–5. doi:10.1038/35000016
- Winston, W. M., Molodowitch, C., & Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science (New York, N. Y.)*, 295(5564), 2456–9. doi:10.1126/science.1068836
- Wyers, F. O. (1983). *Drosophila melanogaster*, 1, 1793–1799.
- Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens*, 4(7), e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098
- Yagi, Y., Nishida, Y., & Ip, Y. T. (2010). Functional analysis of Toll-related genes in *Drosophila*. *Development, growth & differentiation*, 52(9), 771–83. doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01213.x
- Yan, N., & Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. *Nature immunology*, 13(3), 214–22. doi:10.1038/ni.2229
- Zambon, R. a, Nandakumar, M., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(20), 7257–62. doi:10.1073/pnas.0409181102
- de Faria, I. J. D. S., Olmo, R. P., Silva, E. G., & Marques, J. T. (2013). dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 33(5), 239–53. doi:10.1089/jir.2013.0026
- van den Berg, A., Mols, J., & Han, J. (2008). RISC-target interaction: cleavage and translational suppression. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(11), 668–77. doi:10.1016/j.bbagr.2008.07.005

