

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia



Emanuele Guimarães Silva

EFEITOS DE PRIMAGEM SOBRE A RESPOSTA ANTIVIRAL DA MOSCA
DROSOPHILA MELANOGASTER

Belo Horizonte

2018

Emanuele Guimarães Silva

**EFEITOS DE PRIMAGEM SOBRE A RESPOSTA ANTIVIRAL DA MOSCA
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. João Trindade Marques

Coorientador: Dr. Álvaro Gil Ferreira

Belo Horizonte

2018

043

Silva, Emanuele Guimarães.

Efeitos de primagem sobre a resposta antiviral da mosca *Drosophila melanogaster* [manuscrito] / Emanuele Guimarães Silva. – 2018.
128 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. João Trindade Marques. Co-orientador: Álvaro Gil Ferreira.
Tese (doutorado) – 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 inata. 5. Memória Imunológica. 6. RNA Interferente Pequeno. I. Marques, João Trindade. II. Ferreira, Álvaro Gil Araújo. 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

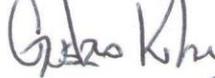


ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE EMANUELE GUIMARÃES SILVA.
 Aos quatorze dias do mês de junho de 2018 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Efeitos de primagem sobre a resposta antiviral da mosca *Drosophila melanogaster*"" , requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: 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: Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rodrigo Cogni (Universidade de São Paulo - USP), aprovada; Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovada; Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. João Trindade Marques - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

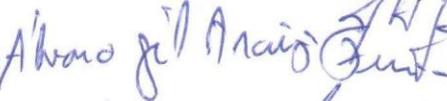
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de junho de 2018.

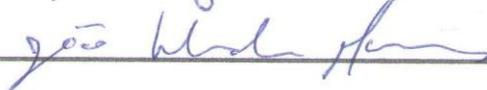
Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG) 

Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn (UFMG) 

Dr. Rodrigo Cogni (Universidade de São Paulo - USP) 

Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina) 

Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira - Coorientador (UFMG) 

Dr. João Trindade Marques - Orientador (UFMG) 

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Trindade Marques, que por seis anos não somente me orientou, mas me deu a oportunidade de trabalhar com a verdadeira ciência. Certamente o seu profissionalismo e vasto conhecimento contribuíram para a minha evolução profissional e pessoal.

Ao Dr. Jean-Luc Imler, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa em Estrasburgo durante sete meses. Agradeço ainda por todas as discussões científicas e contribuições para o nosso trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Álvaro Gil, que por muitas vezes me auxiliou na parte experimental e mais ainda, contribuiu com inúmeras discussões e ideias para o projeto.

À pós-graduação de Imunologia e Bioquímica da UFMG, principalmente ao Orlando e Alexandre, que sempre se dispuseram a me ajudar nas situações burocráticas.

Às agencias financiadoras, CAPES, CNPq, Fapemig e PRPq/UFMG.

À prof. Erna Kroon, por ter aberto as portas do Laboratório de Vírus durante o período que realizei o estágio, e a todos os colegas de lá como Ana Paula Moreira e João Rodrigues pelos ensinamentos. Agradeço especialmente à Kátia Paulino com quem pude trabalhar diretamente e iniciar meus aprendizados na pesquisa.

Aos ICs Thiago Henrique, Juliana Armache, Neide Raphael e Siad Cédric (agora mestrando!), por toda a disposição, ideias e muito auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos de laboratório, Isaque, Roenick e Flávia, que por tantas vezes me auxiliaram na realização de experimentos, análises de dados e discussões científicas.

À professora Fabíola Ribeiro, que juntamente com o prof. João Marques, sabem administrar os laboratórios com muito profissionalismo, competência e prezando sempre pela harmonia do ambiente.

Aos membros do Laboratório de RNAi e Neurobioquímica....A cada um de vocês, só tenho a agradecer pelo excelente convívio durante estes anos. Cada um apresenta uma característica que torna o ambiente mais prazeroso de trabalhar! Agradeço especialmente à Flavinha e à Isabella, e a todos os outros amigos que vida acadêmica me presenteou.

Aos meus pais, que nunca mediam esforços para que eu pudesse estudar. Vocês são minha base; obrigada por sempre me apoiarem em minhas decisões. Exemplos da minha vida.

A toda minha família que é meu porto-seguro, especialmente aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e compreensão por tantas vezes que não pude estar presente.

Ao Hugo, por todo o companheirismo, apoio, ajuda e paciência e aos seus pais, por toda solidariedade que tiveram comigo especialmente durante estes últimos quatro anos.

Às minhas amigas “flores” por estarem sempre ao meu lado, participando especialmente desta etapa da minha vida e me ajudando sempre que as dificuldades apareciam.

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

A Deus, por não me deixar cair.

RESUMO

Os insetos apresentam a capacidade de agir como vetores de arbovírus que são transmitidos a hospedeiros vertebrados. Recentemente, a transmissão de arbovírus por mosquitos, como vírus da Dengue e Zika, tornou-se foco de estudos. Durante epidemias, os insetos podem ser expostos a múltiplas infecções pelo mesmo arbovírus ou outros distintos sendo que a interação dos arbovírus com o sistema imune do inseto vetor é determinante para transmissão ao hospedeiro. Os insetos não apresentam imunidade adaptativa e dependem das repostas imunes inatas como mecanismo imune contra patógenos. No entanto, a exposição prévia de moscas *Drosophila melanogaster* a bactérias e parasitos induzem um mecanismo de proteção contra uma infecção subsequente. Este fenômeno de memória imunológica associado às repostas imunes inatas é referido como primagem imune. Em nosso trabalho, utilizamos *Drosophila* como modelo de inseto para avaliar os efeitos de primagem gerados por infecções virais e identificar os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito. Em nosso modelo, nós utilizamos os vírus VSV (*Vesicular stomatitis virus*) e SINV (*Sindibis virus*) por apresentarem estratégias de replicação distintas. Nós verificamos que uma prévia infecção pelo VSV interfere negativamente sobre uma infecção viral homóloga, mas não em uma infecção heteróloga. Observamos também que vírus inativados não induzem o efeito de primagem de maneira consistente. Diferentemente, a infecção primária pelo vírus vivo interfere fortemente com a infecção secundária. Como a replicação viral é importante para mediar o efeito de interferência, um intermediário de dupla fita de RNA (dsRNA) poderia ser o principal ativador deste efeito. O tratamento prévio com dsRNA complementar a sequências de genes essenciais do VSV e SINV inibiu significativamente a replicação de um vírus em uma infecção subsequente. Nós também utilizamos um dsRNA complementar às sequências de GFP, um gene repórter expresso nos vírus transgênicos, VSV-GFP e SINV-GFP, mas dispensável para a replicação viral. O tratamento prévio com dsGFP não interferiu com a replicação de ambos os vírus, indicando que o RNA genômico não é diretamente silenciado pelos siRNAs em AGO2 e sim outras espécies de RNA, como transcritos. Moscas deficientes para a via de siRNAi foram capazes de controlar a replicação viral após a infecção primária pelo VSV, assim como as moscas controles. Assim, o efeito de interferência observado por nós provavelmente não constitui um

mecanismo de primagem imune inata e sim um mecanismo de competição viral. Apesar de não identificarmos a primagem antiviral, nosso modelo nos permitiu caracterizar uma parte importante do silenciamento da via de siRNAi.

Possivelmente, o mecanismo de inibição da replicação de vírus de RNA por AGO2 seja mediado pelo silenciamento de transcritos virais e não pelo silenciamento do RNA genômico em insetos. O estudo da biologia molecular do principal mecanismo antiviral de insetos pode ser eventualmente aplicado em novas estratégias para o controle de arboviroses no inseto vetor.

Palavras-chave: resposta antiviral, primagem imune, via de siRNAs, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Insects have the capacity to act as vectors for arbovirus transmission to vertebrate hosts. In recent years, mosquitoes transmitting arboviruses, such as the dengue and Zika viruses have become the focus of studies. During an outbreak insect can be exposed to multiple infections by the same arbovirus or other distinct species. Arbovirus may interact with the immune system of the vector for efficient transmission to host. Insects lack adaptive immunity and rely exclusively on innate immune mechanisms. Nevertheless, previous exposure to bacteria and parasites can increase protection to a subsequent challenge in insects and other invertebrates. This phenomenon of memory associated with the innate immune system has been termed immune priming. Here we used *Drosophila melanogaster* as an insect model to evaluate the priming effect generated by viral infections and identify molecular mechanisms involving on this effect. In our model, we chose *Vesicular stomatitis virus* (VSV) and *Sindbis virus* (SINV) because they have distinct strategies of replication. We reported that primary infection by VSV can negatively interfere with secondary infection by the same virus, but not to a different one. Inactivated virus did not induce consistently priming effect. In contrast, first infection by live virus strongly interferes with virus from second infection. Since that viral replication is essential to promote interference effect, we thought that dsRNA could be the main trigger of this phenomenon. A prior treatment with dsRNA corresponding to essential genes for VSV and SINV strongly inhibits their replication. We also used dsRNA corresponding to the GFP sequence, a reporter gene that is present in the transgenic viruses, VSV-GFP and SINV-GFP, but is dispensable for virus replication. Prior treatment with dsGFP did not interfere with both virus replication. This indicates that the RNA genome is not directly silenced by siRNAs onto AGO2, and other RNA species may be the targets, like transcripts. siRNAi deficient flies were still capable of controlling second virus replication after primary infection by VSV. This result suggested that interference effect is not a kind of innate immune priming and is likely a viral competition. Although we did not detect immune priming in flies, our model allows us to characterize the silencing step of siRNAi pathway. It is possible that the inhibitory mechanism by AGO2 to control RNA virus infection in insects is mediated by silencing of viral transcripts rather than viral genome. The study of molecular biology of the main antiviral response in insects can

be eventually used to design new strategies for arbovirus controlling in the insect vector.

Keywords: antiviral response, immune priming, siRNAs pathway, *Drosophila melanogaster*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As vias de siRNAs em <i>Drosophila</i>	23
Figura 2: Ciclo de vida da mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Figura 3: O genoma do VSV e o seu ciclo de replicação.	28
Figura 4: O genoma de <i>Alphavirus</i>	30
Figura 5: A infecção primária pelo VSV interfere com uma infecção secundária pelo mesmo vírus em células S2	42
Figura 6: A infecção primária pelo VSV interfere uma infecção secundária pelo mesmo vírus em moscas selvagens	44
Figura 7: A infecção primária pelo VSV facilita uma infecção secundária pelo SINV em células S2.....	46
Figura 8: A infecção primária pelo VSV não afeta de maneira consistente uma infecção secundária heteróloga em moscas selvagens	48
Figura 9: Efeito da primagem de moscas selvagens pelo VSV inativado por UV sobre uma infecção pelo mesmo vírus.....	51
Figura 10: Efeito da primagem de moscas selvagens pelo SINV inativado por UV sobre uma infecção pelo mesmo vírus.....	53
Figura 11: Análise do efeito de primagem pelo vírus inativado em diferentes genótipos de moscas selvagens.....	55
Figura 12: A influência da temperatura sobre o efeito de primagem pelo vírus inativado.....	57
Figura 13: Cinética de infecção do VSV-GFP após a primagem pelo VSV inativado em moscas selvagens.....	58
Figura 14: Efeito da primagem pelo VSV inativado em diferentes doses virais60	
Figura 15: Efeito da dose do VSV inativado sobre a infecção homóloga pelo virus vivo	61
Figura 16: A primagem por um vírus inativado interfere positivamente sobre a replicação do DENV1 em mosquitos.....	63

Figura 17: O tratamento com dsRNA complementar a sequencias virais reduz a replicação do VSV de uma infecção subsequente	65
Figura 18: O processamento do dsRNA induz à degradação de RNAs virais da infecção por VSV.....	68
Figura 19: Cinética de replicação viral após o tratamento com dsRNAs complementares a sequências de VSV.....	72
Figura 20: O dsRNA complementar ao GFP silencia a produção endógena do gene <i>in vivo</i>	74
Figura 21: Cinética de replicação viral após o tratamento com dsRNAs complementares a sequências de SINV.....	77
Figura 22: O efeito de interferência pelo VSV sobre o estabelecimento de uma infecção viral homóloga não é dependente da via de RNAi.	81
Figura 23: Análise da contribuição dos hemócitos no controle da infecção secundária viral após a infecção primária homóloga	83
Figura 24: Modelo do mecanismo de inibição do RNA viral mediado pelos siRNAs.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para qPCR e PCR	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGO2 - *Argonauta-2*

CHICKV - *Chikungunya virus*

CrPV - *Cricket paralysis virus*

Dcr-2 - *Dicer-2*

DCV - *Drosophila C virus*

DENV - *Dengue virus*

DMelSV - *Sigma virus*

dsRBP - *dsRNA binding protein*

dsRNA - *double-strand RNA*

FHV *Flock house virus*

HTAs - *host-target antivirals*

IRES - *internal ribosome entry site*

Loqs-PD - *Loquacious-PD*

miRNAs - *microRNAs*

MOI - *multiplicity of infection*

nsP - *non-structural protein*

PFU - *plaque forming units*

piRNAs - *piwi-interacting RNAs*

qPCR - *PCR quantitativo*

RdRp - *RNA dependent RNA polymerase*

RNAi - *RNA de interferência*

Rpl32 - *Ribosomal particle L32*

SINV - *Sindbis virus*

sP – *structural protein*

siRISC - *small interfering RNA-induced silencing complex*

siRNAs - *small interfering RNAs*

vDNAs - *viral DNAs*

VSV - *Vesicular stomatitis vírus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Mecanismos antivirais em <i>Drosophila</i>	19
1.1.1 A via de siRNAs em <i>Drosophila</i>	21
1.2 Modelos de estudo	24
1.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	24
1.2.2 Modelos virais	27
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Estoques virais	35
4.2 Infecção em células S2	35
4.3 Estoque, manutenção e cruzamento das moscas	36
4.4 Microinjeção em moscas	36
4.5 Preparação de dsRNA e tratamento em moscas	37
4.6 Extração de RNA e transcrição reversa	37
4.7 Quantificação relativa de RNA	38
5. RESULTADOS	41
5.1 Efeito de uma infecção primária pelo VSV sobre infecções secundárias homóloga ou heteróloga em <i>Drosophila melanogaster</i>	41
5.2 Efeito da primagem de moscas selvagens por um vírus inativado sobre a infecção viral	49
5.3 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de moscas com dsRNA contra o VSV sobre uma infecção viral	64
5.5 Mecanismo de primagem da via de siRNAs contra o VSV pelo tratamento com dsRNAs	66
5.6 Mecanismo de primagem da via de siRNAs contra o SINV após o tratamento com dsRNAs	75
5.7 O papel de componentes de mecanismos antivirais no controle da infecção secundária pelo VSV em moscas expostas a uma infecção primária homóloga	79
6. DISCUSSÃO	85

7. CONCLUSÕES	92
8. PERSPECTIVAS	93
9. BIBLIOGRAFIA	94

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam o grupo mais diversos de animais, compreendendo aproximadamente 70% de todas as espécies (Misof, Liu et al. 2014). A vasta diversidade permite com que os insetos sejam alvos de estudos em diferentes contextos e tenham a mais variada importância para a espécie humana. Um destes casos é a capacidade que vários insetos têm de agir como vetores para a transmissão de patógenos a plantas, humanos e outros animais. (Misof, Liu et al. 2014, Marques and Imler 2016). Assim, o estudo das interações vírus-insetos, pode prover informações sobre os mecanismos antivirais, sejam eles conservados ou divergentes entre outros organismos (Martins, Imler et al. 2016).

Ao longo das suas vidas, os insetos podem interagir com diferentes tipos virais, sem necessariamente interferir com o fitness do hospedeiro (Kanthong, Khemnu et al. 2010). Neste cenário, as infecções virais tornam-se persistentes, uma vez que não são eliminadas pelo sistema imune do inseto vetor. Um exemplo da interação vírus-inseto, são as arboviroses transmitidas primariamente por mosquitos. Nos últimos anos, os arbovírus expandiram globalmente com aumento do número e frequência de epidemias, como é caso do vírus da Dengue, vírus da Zika e mais recentemente, o vírus da febre amarela no Brasil. Durante as epidemias o inseto vetor pode ser exposto a infecções múltiplas pelo mesmo arbovírus ou outro distinto, levando a ativação de mecanismos imunes que controlam a infecção viral, sem necessariamente eliminá-la.

A imunidade inata compreende o principal mecanismo imune de insetos, assim como nos demais invertebrados. As respostas imunes inatas são rapidamente ativadas após uma infecção e, em geral, tem pouca especificidade e ausência de uma memória imunológica (Netea, Quintin et al. 2011). No entanto, alguns trabalhos já demonstraram a existência de um aumento da resistência a infecções secundárias após uma prévia exposição em insetos. Em 2010, Rodrigues e colaboradores demonstraram que a exposição prévia ao *Plasmodium* em mosquitos *Anopheles gambiae*, conferiu imunidade contra uma subsequente infecção pelo mesmo patógeno, na presença da microbiota (Rodrigues, Brayner et al. 2010). Esta imunidade é dependente de um fator de diferenciação de fagócitos circulantes liberados na hemolinfa, o complexo de Lipoxina / Lipocalina (Ramirez, de Almeida Oliveira et al. 2015). Os fagócitos também mediarão proteção contra *Streptococcus pneumoniae*

em moscas desafiadas com uma dose sub-letal da mesma bactéria (Pham, Dionne et al. 2007).

O termo “imunidade treinada” ou “primagem imune inata” se refere a um aumento temporário das respostas imunes inatas após o primeiro estímulo por um determinado patógeno, o que leva à proteção do organismo contra uma infecção secundária (Netea, Quintin et al. 2011). Neste caso, a memória se difere da memória clássica adaptativa, representada principalmente pela expansão clonal e específica de células T e B. Já a memória da imunidade treinada se refere ao aumento das respostas imunes que o organismo desenvolve mediante a infecção prévia contra uma re-infecção, sendo esta resposta específica ou não à infecção primária (Netea, Quintin et al. 2011, Quintin, Cheng et al. 2014).

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, tem sido um importante modelo de estudo da imunidade inata desde o início dos anos 90 (Hoffmann, Kafatos et al. 1999). Mais recentemente, este modelo também foi utilizado para avaliar a primagem imune antiviral em insetos. Em 2009, Saleh e colaboradores observaram a diminuição da replicação do vírus SINV (*Sindbis virus*) em moscas, ao introduzirem um dsRNA (do inglês, *double-strand RNA*) complementar a sequências do vírus. Este efeito de proteção não foi observado na ausência da via de RNAi (RNA de interferência), o principal mecanismo antiviral de insetos. Neste mesmo trabalho, foi proposto um caráter sistêmico da via ao hipotetizarem que o dsRNA gerado durante a infecção viral seria capaz de entrar em uma célula não infectada, após a lise das células infectadas. O dsRNA seria processado pela via de RNAi e protegeria a célula não infectada contra uma infecção subsequente pelo mesmo vírus (Saleh, Tassetto et al. 2009). Estruturas similares a nanotubos parecem estar relacionados com a transferência de dsRNA e componentes do maquinário da via de RNAi entre células (Karlikow, Goic et al. 2016).

O papel da via de RNAi também foi alvo de estudos recentes sobre a primagem imune contra vírus em *Drosophila*. Goic e colaboradores observaram a produção de formas de DNA virais dependente da via de RNAi após a retro-transcrição de fragmentos de sequências virais durante a infecção por alguns vírus de RNA em moscas (Goic, Vodovar et al. 2013). O mesmo grupo demonstrou a produção das espécies de vDNAs (do inglês, *viral DNAs*) em mosquitos infectados com DENV (Dengue virus) ou CHICKV (Chikungunya vírus) associando a participação destas moléculas à tolerância viral (Goic, Stapleford et al. 2016). Os hemócitos, principais

fagócitos circulantes em *Drosophila*, parecem mediar a produção de vDNAs, ao endocitarem um dsRNA sintético complementar às sequências de SINV. A produção de vDNAs em hemócitos foi associada a uma amplificação da resposta antiviral mediada pela via de RNAi, o que conferiria proteção contra uma infecção pelo mesmo vírus em moscas (Tassetto, Kunitomi et al. 2017). Recentemente, foi proposto que os vDNAs podem apresentar formas circulares após a infecção por alguns tipos de vírus de RNA em moscas e mosquitos. Neste trabalho foi demonstrado que mutações no domínio helicase de Dcr-2 (*Dicer-2*), uma enzima central da via de RNAi, interferem na produção dos vDNAs circulares e como consequência, na resposta antiviral (Poirier, Goic et al. 2018).

1.1 Mecanismos antivirais em *Drosophila*

A imunidade antiviral em *Drosophila* consiste em mecanismos intrínsecos, baseados na via de RNAi, nas repostas induzíveis e em fatores de restrição (Mussabekova, Daeffler et al. 2017). As repostas induzíveis controlam a expressão de genes relacionados ao controle da infecção viral e agem de forma específica contra diferentes vírus.

A via de Jak -STAT é um dos principais mecanismos de defesa antiviral em mamíferos uma vez que está envolvida na sinalização dos interferons do tipo I (Dupuis, Jouanguy et al. 2003). Em *Drosophila*, a via participa no controle da infecção por alguns tipos vírus da família *Dicistroviridae*. Moscas mutantes para o gene *hopscotch*, um análogo da quinase JAK, apresentaram aumento da carga viral de DVC (*Drosophila C virus*) e mortalidade após a infecção viral (Dostert, Jouanguy et al. 2005).

A via de *Toll* que classicamente age contra bactérias gram-positivas também já foi relacionada ao controle de algumas infecções virais em *Drosophila*. Um trabalho realizado por Ferreira e colaboradores mostrou que a via é necessária para a resistência contra a infecção oral com DCV, *Nora virus*, CrPV (*Cricket paralysis virus*) e FHV (*Flock house virus*) em moscas (Ferreira, Naylor et al. 2014). 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*, um fator de transcrição da via de *Toll*, apresentam

homologia ao fator transcricional NF- κ B em mamíferos (Sabin, Hanna et al. 2010). A regulação da via de IMD/NF- κ B é imunomodulada pela expressão do gene *Diedel*, induzido após a infecção por SINV (Lamiable, Kellenberger et al. 2016). Neste trabalho foi mostrado que *Diedel* é importante tanto em controlar a infecção viral, quanto em manter a homeostase celular.

Drosophila, assim como outros insetos, também montam uma resposta transcricional após a infecção viral. A maioria destes genes não agem diretamente no vírus, mas contribuem para a resposta antiviral e homeostase, como é o caso do gene *Diedel*, descrito anteriormente. Um outro exemplo são os genes *TotM* e *vir-1*, ambos induzidos pela via de JaK-STAT e expressos após a infecção por DCV, FHV e SINV (Dostert, Jouanguy et al. 2005, Kemp, Mueller et al. 2013). A infecção por DCV também induz a expressão do gene *Vago*. Este gene parece controlar a infecção viral no *fat body* das moscas de maneira dependente do domínio helicase de Dicer-2 (Deddouche, Matt et al. 2008).

A apoptose também é considerado uma outra estratégia antiviral *Drosophila* uma vez que induz a eliminação de células infectadas (Clem 2015). O *clearance* das células infectadas é mediado principalmente pelos hemócitos que são os fagócitos circulantes em moscas. A apoptose e a atividade fagocítica dos hemócitos promovem o controle da infecção por FHV, DCV e CrPV em moscas (Costa, Jan et al. 2009, Nainu, Tanaka et al. 2015, Lamiable, Kellenberger et al. 2016).

Os fatores de restrição são componentes na célula do hospedeiro que podem interferir em algum passo do ciclo de replicação viral (Mussabekova, Daeflner et al. 2017). Embora muitos fatores de restrição existam em *Drosophila*, a maioria deles não é bem caracterizado. Grande parte dos estudos, identificaram os fatores de restrição em moscas infectadas com patógenos virais naturais como DMelSV (*Sigma virus*) e DCV (Cogni, Cao et al. 2016). Um destes fatores é *locus ref(2)P*, que apresenta uma variação genética, afetando replicação de DMelSV em *Drosophila* (Contamine, Petitjean et al. 1989).

A via de siRNAs (do inglês, *small interfering RNAs*) é descrita como o principal mecanismo antiviral em insetos (Wang, Aliyari et al. 2006). Esta via assim como as vias de miRNAs (*microRNAs*) e piRNAs (do inglês, *piwi-interacting RNAs*), leva a produção de pequenos RNAs não codificantes que associados a proteínas da família

Argonata levam à degradação de sequências específicas de RNAs. *Drosophila* apresenta as três classes destes RNAs não codificantes.

Os miRNAs estão envolvidos regulação pós-transcricional de genes e participam nas homeostase celular e de vias de desenvolvimento (Bartel 2004). Alguns vírus são alvos dos miRNAs em *Drosophila*, embora não é claro como estes pequenos RNAs possam controlar a infecção viral (Hussain and Asgari 2014). Os piRNAs estão envolvidos no controle de elementos móveis na linhagem germinativa (Malone, Brennecke et al. 2009). Em *Drosophila*, a presença de piRNAs derivados de vírus foi detectada somente em células de ovário, indicando que esta via não deve participar da resposta antiviral em moscas (Petit, Mongelli et al. 2016).

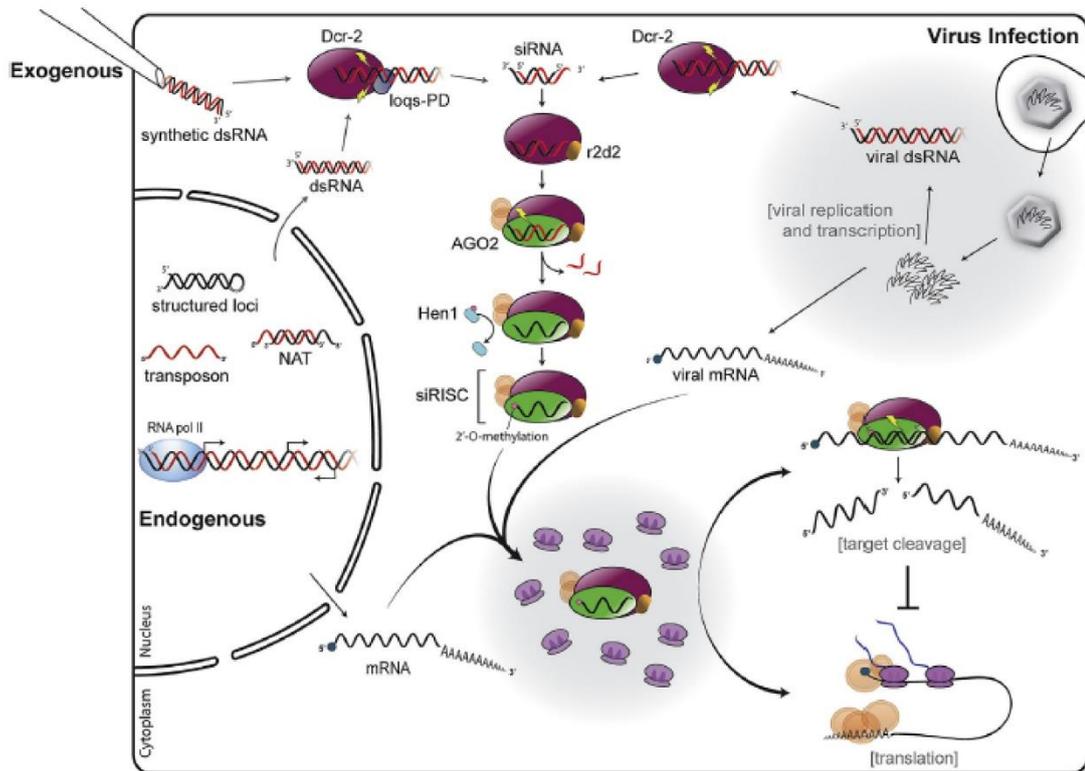
1.1.1 A via de siRNAs em *Drosophila*

Durante a infecção viral em células de *Drosophila*, há a produção de longos percussores de dsRNAs derivados da replicação do vírus. O dsRNA é reconhecido e processado a pequenos duplex de RNA com tamanho de 21 nucleotídeos, os siRNAs, pela Dcr-2, uma RNase citoplasmática do tipo III. Modificações terminais do dsRNA, como extremidades cegas, 5'-trifosfato, saliências (pontas não pareadas) ou a presença de estruturas secundárias são características de reconhecimento pela enzima (de Faria, Olmo et al. 2013).

Os siRNAs associados a Dcr-2 formam um complexo de heterodímero com r2d2, uma dsRBP (do inglês, *dsRNA binding protein*). Dcr-2/r2d2 entrega o duplex de siRNAs a AGO2 (*Argonata-2*) para formar o complexo de silenciamento siRISC (do inglês, *small interfering RNA-induced silencing complex*). No complexo RISC, uma das fitas do duplex de siRNA, a fita passageira, é clivada pela AGO2. A outra fita do duplex é mantida e é então 2'-O-metilada pela enzima DmHen1, para estabilizar o complexo de silenciamento. O siRNA no siRISC ativo guia AGO2 para encontrar sequências complementares de RNAs virais, dos quais são clivados pela AGO2, levando a redução da replicação viral (Carthew and Sontheimer 2009) (Figura 1). RNAs poliadenilados, presumivelmente RNAs mensageiros, parecem ser os alvos da via de siRNA (Marques, Wang et al. 2013). Desta maneira, AGO2 encontra-se próxima a ribossomos celulares para monitorar e clivar RNAs mensageiros virais com

sequencias completares ao siRNA no siRISC, prevenindo a tradução do RNA mensageiro alvo (Caudy, Myers et al. 2002, Ishizuka, Siomi et al. 2002).

Um dsRNA de origem endógena ou exógena também pode ativar a via de siRNA. RNAs endógenos derivados de loci estruturados, transcritos senso-antisense, transcrição bidirecional e elementos transponíveis são fontes de dsRNA endógenos, ativando a via de endo-siRNA (Czech, Malone et al. 2008, Okamura, Chung et al. 2008). dsRNAs produzidos *in vitro*, são fontes para ativação da via de exo-siRNA (Kennerdell and Carthew 1998, Tuschl, Zamore et al. 1999, Kennerdell and Carthew 2000). Apesar de diferentes fontes de dsRNAs – endógenos, exógenos ou virais – ativarem a via de siRNA e apresentarem o core central composto por Dcr2, r2d2 e AGO2, o reconhecimento destas moléculas pela Dcr-2 parece ser um passo diferencial na ativação da via. A isoforma da proteína Loqs-PD (*Loquacious-PD*), um co-fator de ligação a dsRNA, é necessária para o processamento de endo-siRNAs ou exo-siRNAs pela Dcr-2, mas é dispensável no caso de RNAs virais (Marques, Kim et al. 2010, Marques, Wang et al. 2013).



(Adaptado de: Soares et al 2014)

Figura 1: As vias de siRNAs em *Drosophila*. dsRNA de origem viral, dsRNA sintético ou dsRNA endógeno podem ativar a via de siRNAs. O processamento de dsRNA endógenos ou exógenos ocorre pelo complexo Dcr-2/Loqs-PD, enquanto para o reconhecimento de dsRNA viral, Dcr-2 age independentemente de Loqs-PD. Em ambos os casos o processamento gera os duplex de siRNAs. O heterodímero Dcr-2-r2d2 entrega os duplex de siRNAs a AGO2 para formar o complexo de silenciamento, RISC. Neste complexo, uma das fitas é clivada pela enzima, enquanto a outra permanece associada à AGO-2 para o reconhecimento de sequências complementares de RNAs, como os RNAs virais. AGO2 normalmente está localizada próxima aos ribossomos celulares para prevenir a tradução de RNAs mensageiros virais ou celulares.

1.2 Modelos de estudo

A utilização de modelos é uma ferramenta importante para se estudar a interação entre patógenos e hospedeiros. Em nosso trabalho utilizamos a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* como modelo de inseto para avaliar os mecanismos moleculares e imunes ativados após a infecção viral. As poderosas ferramentas disponíveis em *Drosophila* utilizadas em conjunto com vírus bem caracterizados fornecem um modelo sistêmico que permite elucidar melhor as respostas imunes antivirais.

O VSV (*Vesicular stomatitis virus*) e o SINV são arbovírus bem caracterizados, com genomas pequenos e sequenciados, o que permite a construção de cepas recombinantes. Embora não sejam vírus naturais de *Drosophila*, estes patógenos infectam as moscas, bem como células de mamíferos, das quais são utilizadas para a multiplicação e produção dos estoques virais. Além do mais, apresentam estratégias de replicação distintas, o que permite explorar características em comuns das respostas antivirais. Muitos trabalhos da literatura já utilizaram estes vírus como modelos de infecção para o entendimento de mecanismos moleculares antivirais em *Drosophila* (Deddouche, Matt et al. 2008, Mueller, Gausson et al. 2010, Marques, Wang et al. 2013, Lamiable, Arnold et al. 2016, Tassetto, Kunitomi et al. 2017, Poirier, Goic et al. 2018).

1.2.1 *Drosophila melanogaster*

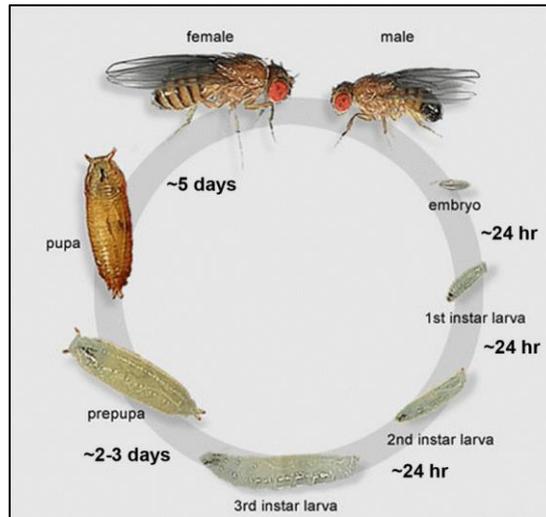
A *Drosophila* é um organismo modelo amplamente utilizado em várias áreas da biologia, destacando a imunidade inata, por apresentar muitos processos biológicos conservados com outros organismos, sejam eles vertebrados ou invertebrados ou mesmo processos específicos de insetos que ainda sim podem ajudar no entendimento da interação vírus-hospedeiro (St Johnston and Nusslein-Volhard 1992, Lemaitre and Hoffmann 2007, Padmanabha and Baker 2014). Por ser hospedeiro natural de alguns vírus, a *Drosophila* se torna um excelente modelo de pesquisa da interação vírus-hospedeiro.

Algumas moléculas induzidas por uma infecção viral em *Drosophila* agem como fatores restrição viral na célula do hospedeiro e são evolutivamente conservadas, podendo ser usadas como HTAs (*do inglês, host-target antivirals*) (Martins, Imler et al.

2016). É o caso da proteína ribossomal RACK1 necessária para a tradução de RNA mensageiros dependente do complexo IRES (do inglês, *internal ribosome entry site*) mas independente do processo canônico de reconhecimento da estrutura 5'-cap. O silenciamento desta proteína interfere na replicação de DCV e CrPV em *Drosophila*, bem como na replicação de HCV em hepatócitos humanos (Majzoub, Hafirassou et al. 2014). O estudo das interações entre *Drosophila* e vírus também pode revelar fatores de restrição específico do inseto, como é o caso do gene *Pastrel*. Este gene codifica uma proteína citoplasmática que parece produzir um fator de restrição de vírus da família *Picornaviridae* em *Drosophila* (Martins, Imler et al. 2016).

Diversas ferramentas facilitam o uso da mosca, como um genoma sequenciado e bem anotado (Adams, Celniker et al. 2000) o que permite a geração de mutantes, além de um banco de dados consolidado que (<http://flybase.org/>) que oferece uma série de ferramentas como *BLAST*, pesquisas por mutantes, genes ortólogos, mapa do genoma da *Drosophila* e interações entre genes e proteínas.

Vários aspectos tornam a mosca da fruta um modelo versátil. Entre eles, a facilidade e praticidade de manutenção de culturas. O custo de manutenção ainda é mais barato quando comparado a outros modelos, como camundongos. Além do mais, as moscas apresentam um ciclo de vida simples, consistindo em quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto, o que facilita e torna mais ágil a realização de experimentos *in vivo* (figura 2).



(Adaptado de: Mondotte e Saleh, 2018)

Figura 2: Ciclo de vida da mosca *Drosophila melanogaster*. *Drosophila* é um inseto holometábolo, passando pelos estágios de embrião, primeiro e segundo estágio de larva, pupa e até chegar no estágio final de adulto.

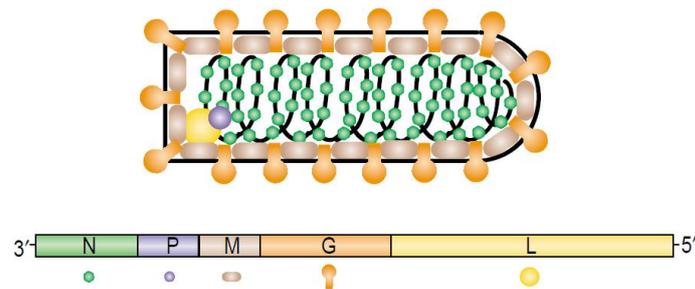
1.2.2 Modelos virais

O VSV é um vírus envelopado, pertencente à família *Rhabdoviridae*, de aproximadamente 180 nanômetros comprimento e 75 de largura. Apresenta como principal hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo, que pode transmitir o vírus a os humanos, gados, cavalos e porcos. O hospedeiro vertebrado pode manifestar a infecção ao produzir vesículas e úlceras em algumas partes do corpo (Lichty, Power et al. 2004).

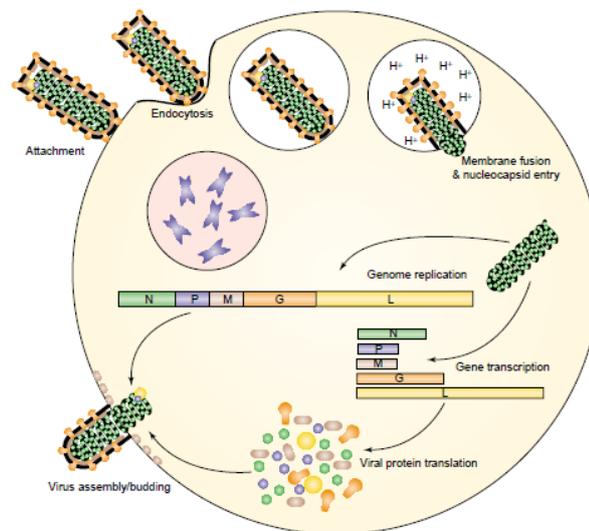
O VSV apresenta um genoma de RNA com polaridade negativa e um tamanho aproximado de 11 kb que codifica cinco proteínas: a nucleoproteína, a fosfoproteína, a proteína de matrix, a glicoproteína e a polimerase viral (figura 3A). A partícula viral penetra na célula do através de receptores do hospedeiro induzindo a endocitose mediada por clatrina. Após a fusão da membrana viral com a membrana da vesícula, o ribonucleocapsídeo é liberado no citoplasma, onde ocorre a transcrição dos genes e replicação do genoma. Cada vírion carrega sua própria RdRp (do inglês, *RNA dependent RNA polymerase*) que se liga na reação 3' UTR do genoma para transcrever sequencialmente cada gene ao reconhecer sinais de início e de parada entre cada um (Morin, Rahmeh et al. 2012). Os RNAs mensageiros são capeados e poliadenilados pela polimerase durante a síntese. Os níveis de expressão de cada transcrito são reduzidos à medida que cada gene subsequente é transcrito devido à falha da polimerase viral e iniciação incompleta nas regiões intergênicas (Morin, Rahmeh et al. 2012).

A replicação começa quando há a produção suficiente de nucleoproteína para encapsidar novos genomas. Intermediários de fita positiva de RNAs são sintetizados pela RdRp a partir do genoma de RNA de fita negativa, para criar genomas virais. Por fim, o ribonucleocapsídeo se associa às proteínas da matrix para a liberação das novas partículas virais através da membrana plasmática. O ciclo replicativo do VSV está representado na figura 3B.

A



B

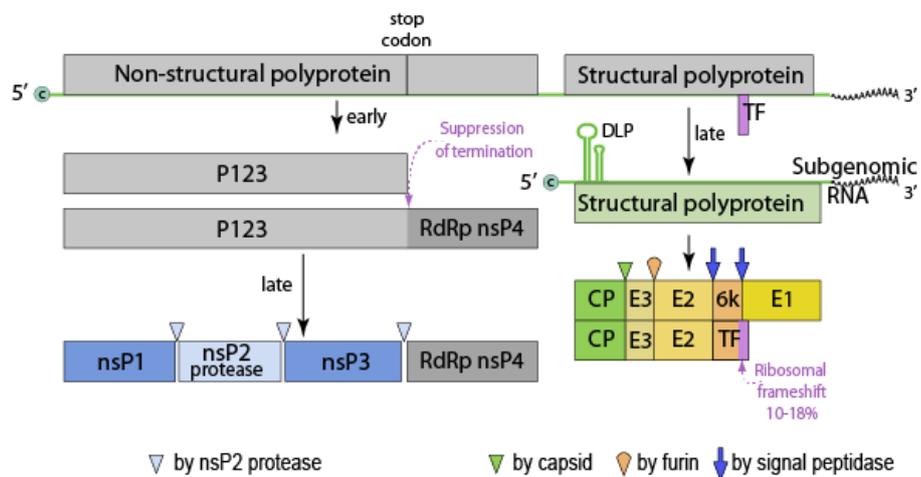


(Adaptado de: Lichty et al 2004)

Figura 3: O genoma do VSV e o seu ciclo de replicação. A) O genoma do VSV consiste em cinco genes que codificam as proteínas virais: a proteína N (nucleoproteína), a proteína P (fosfoproteína, do inglês, phosphoprotein), a proteína M (proteína de matrix, do inglês, matrix protein) a proteína G (glicoproteína) e a proteína L (polimerase, do inglês, large polymerase). B) A penetração das partículas virais na célula é mediada pelas glicoproteínas do VSV, formando vesículas endossomais no citoplasma celular. A acidificação das vesículas gera uma mudança conformacional nas glicoproteínas permitindo a fusão destas com a membrana do endossoma. O nucleocapsídeo é capaz de escapar para o citoplasma, onde a RdRp transcreve individualmente cada RNA mensageiro, para ser traduzido a proteínas virais pelos ribossomos celulares. Em uma fase tardia da infecção, a polimerase viral para de transcrever os genes e começa a síntese de novos genomas a partir de intermediários de RNA de polaridade positiva. Finalmente, as proteínas virais e o genoma são montados em partículas virais completas para serem liberados por brotamento através da membrana plasmática celular.

O SINV também é um vírus envelopado e pertence à família *Togaviridae*. Apresenta estrutura esférica e icosaédrica, com 65-70 nanômetros de diâmetro. Este vírus é transmitido por mosquitos *Culex* e ocasionalmente por mosquitos *Aedes* a várias espécies de pássaros. Pode ser também transmitido a humanos, podendo ocasionar poliartrites, erupção cutânea e febre (Adouchief, Smura et al. 2016).

O SINV apresenta um genoma linear, de RNA fita simples, polaridade positiva, com tamanho entre 11 a 12 kb, sendo poliadenilado e capeado. O seu genoma consiste em duas ORFs: uma delas codifica a sequência gênica da poliproteína não estrutural, enquanto a outra codifica a sequência gênica da poliproteína estrutural que é expressa em forma de uma subgenoma de RNA na fase tardia da infecção (figura 4).



(Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/625>)

Figura 4 O genoma de *Alphavirus*. O genoma do SINV é de RNA de fita simples, polaridade positiva, poliadenilado e capeado. Na fase inicial da infecção, o genoma é diretamente traduzido para gerar uma poliproteína não estrutural que expressa a RdRp. Após consecutivas clivagens da poliproteína, é formado o complexo replicativo composto pelas proteínas não estruturais (nsPs) que transcrevem o subgenoma de RNA a partir do antígeno viral. O subgenoma é traduzido para gerar uma poliproteína estrutural, que após a sua clivagem gera o capsídeo, as glicoproteínas e a proteína 6K.

A entrada do SINV na célula ocorre pela ligação das glicoproteínas aos receptores celulares, permitindo a entrada da partícula viral por endocitose mediada por clatrina. A fusão da membrana endossomal com a nucleoproteína libera o genoma para o citoplasma da célula. O genoma viral é então diretamente traduzido a uma poliproteína não estrutural, a nsP1234 (do inglês, *non-structural protein*) seguido da clivagem proteolítica pela nsP2, para gerar o complexo replicativo composto por P123 e nsP4. Este complexo sintetiza a fita de RNA senso negativa a partir do genoma viral que servirá de *template* para síntese do genoma e subgenoma. Após a clivagem de P123 para gerar nsP1 e P23, a síntese do antígeno é interrompida e o complexo passa a sintetizar RNA fita senso positiva, juntamente com nsP4, resultando na produção do RNA genômico e subgenômico. O complexo P23 é instável e rapidamente é processado em nsP2 e nsP3, resultando na completa clivagem do complexo replicativo (Rupp, Sokoloski et al. 2015). Após a transcrição e tradução do subgenoma, há produção de uma poliproteína estrutural que é clivada para gerar o capsídeo e as demais proteínas estruturais. O capsídeo associado ao genoma forma o nucleocapsídeo que é posteriormente envelopado e liberado da célula em forma de uma nova partícula viral (Leung, Ng et al. 2011).

O complexo replicativo do SINV apresenta algumas características. Uma delas é que, mesmo que nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 sejam capazes de continuar sintetizando o genoma e o subgenoma de RNA, este complexo favorece a produção do subgenoma (Lemm, Rumenapf et al. 1994, Shirako and Strauss 1994). Outra característica é que apesar de nsP4 apresentar o domínio RdRp que reconhece os promotores para a produção da fita negativa e positiva de RNA, esta proteína necessita de todas as outras proteínas nsPs para a ligação da polimerase ao RNA viral (Pietila, Hellstrom et al. 2017). Um vez que é formado o complexo replicativo, as proteínas nsPs parecem se concentrar em locais de invaginações de membrana, as esférulas, onde os intermediários de dsRNA ficariam protegidos (Frolova, Gorchakov et al. 2010).

Em nosso trabalho, criamos um modelo de infecção artificial em *Drosophila melanogaster* para avaliar a capacidade dos insetos em montarem uma resposta imune contra uma infecção viral secundária, após um prévio estímulo pelo mesmo vírus ou um vírus distinto. Para isto, precisamos considerar as repostas antivirais da

mosca, bem como a dinâmica de replicação de cada vírus a ser utilizado em nosso modelo, para avaliar os processos moleculares envolvidos no fenômeno.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Durante epidemias de arboviroses, o inseto pode ser exposto muitas vezes ao mesmo vírus ou pode ser infectado por vírus distintos sem necessariamente eliminá-los pelo seu sistema imune. Este fato permite que os vírus estejam em constante interação com a imunidade antiviral do inseto vetor.

Apesar de os insetos serem vetores de importantes doenças para os seres humanos, poucos trabalhos na literatura exploraram a interação dos arbovírus com o sistema imune do inseto, principalmente se haveria primagem imune antiviral. Este mecanismo poderia diretamente influenciar na transmissão dos arbovírus aos hospedeiros vertebrados. Assim, nosso trabalho torna-se relevante ao desenvolver um modelo de estímulos virais sucessivos em *Drosophila melanogaster* a fim de caracterizar como um prévio estímulo viral poderia alterar o desenvolvimento de uma infecção viral secundária em insetos.

Estudos sobre a primagem das respostas antivirais em um inseto que é um organismo modelo bem caracterizado poderia eventualmente ter aplicações no desenvolvimento de estratégias de controle da transmissão de arboviroses.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da primagem sobre o sistema imune da mosca *Drosophila melanogaster* durante infecções virais e identificar os mecanismos moleculares envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

1. Padronizar um modelo de infecção primária e infecção secundária por vírus homólogos ou heterólogos em moscas *Drosophila melanogaster* utilizando VSV e o SINV;
2. Caracterizar o efeito de uma infecção viral primária sobre a replicação do vírus da infecção secundária homóloga ou heteróloga;
3. Caracterizar os determinantes virais necessários para os efeitos de uma infecção primária sobre a secundária;
4. Avaliar os mecanismos moleculares que possam interferir na replicação do VSV ou SINV após uma prévia exposição das moscas ao um estímulo viral;
5. Avaliar o papel de vias e componentes antivirais presentes no hospedeiro que possam controlar a infecção secundária pelo VSV após a infecção viral pelo mesmo vírus.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estoques virais

Células S2 (ATCC® CRL-1963™) derivadas de embrião de *Drosophila melanogaster* foram crescidas em meio Schneider (Gibco®) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, Gibco®), antibióticos gentamicina (50 mg/L), penicilina potássica (200 U/mL) e fungizona (2.5 mg/L) e mantidas em estufa a 25°C.

O VSV selvagem do subtipo *Indiana virus* foi cedido pela professora Erna Kroon do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais. O VSV transgênico que expressa a proteína GFP (VSV-GFP) foi cedido pelo Dr. Curt Horvath, da *Northwestern University*. O SINV transgênico que expressa a proteína GFP (SINV-GFP) foi cedido pelo Dr. Ilya Frolov (*The University of Texas Medical Branch*).

Todos os vírus foram multiplicados em células VERO, para a produção dos estoques virais. Para isto, utilizamos a MOI (do inglês, *multiplicity of infection*) de 0,001 para o VSV/VSV-GFP e MOI de 0,1 para o SINV 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 inóculo viral, adicionamos meio MEM suplementado com 10% de SFB e mantivemos as garrafas de células de CO₂ a 37° C. O efeito citopático dos vírus foi observado em aproximadamente 20 a 36 horas após a infecção. Aliquotamos o sobrenadante, após a clarificação do debris celular e armazenamos à temperatura de -80°C até o momento do uso. A titulação de todos os vírus foi feita pelo método de PFU (do inglês, *plaque forming units*) em células VERO.

Para a inativação do VSV, SINV e DENV-1 utilizamos o equipamento UVP *Longwave Ultraviolet Crosslinker 365 nm 115 VAC*, onde o vírus foi submetido a um comprimento de onda de 260 J/m² conforme indicado no trabalho de Lytle e Sagripanti (Lytle and Sagripanti 2005).

4.2 Infecção em células S2

Multiplicamos as células S2 em meio *Schneider* suplementado com 10% de SFB para as infecções virais e as mantivemos em homogeneizador hematológico para

a adsorção viral de 1 hora. Após este tempo, centrifugamos e lavamos células em meio *Schneider* para a retirada do inóculo viral. Em seguida, acrescentamos o meio suplementado com 10% de SFB às células e as plaqueamos na quantidade de $2,0 \times 10^6$ células/poço em placas de seis poços das quais foram mantidas em estufa a 25°C. Realizamos as infecções virais baseada em uma MOI para cada tipo viral.

4.3 Estoque, manutenção e cruzamento das moscas

Para a manutenção das moscas, mantivemos cada linhagem em tubos contendo comida a base de cereal, glicose e levedura e acondicionadas em estufas com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Anteriormente aos experimentos, nós transferíamos machos e fêmeas adultos do estoque para novos tubos para a expansão das linhagens. Deixamos as moscas por 2-3 dias para a postura de ovos e então, limpávamos os tubos, retirando os adultos. Após o nascimento das moscas, em torno de dez dias, fizemos a separação das fêmeas com idade entre 2-4 dias de vida.

Em nossos experimentos utilizamos moscas selvagens da linhagem *Canton S* e *Oregon R*, além da linhagem isogênica, *w[1118]*. Para avaliar a via de RNAi, utilizamos moscas deficientes em *Dcr2/r2d2* (*r2d2(1)dcr-2(L811fdx)/Df(2R)BSC45*) e seus controles *r2d2(1)dcr-2(L811fdx)/ Df(2R)BSC45-P{genomic rescue dcr-2}* e moscas deficientes em *Ago2* (*Ago2[414]/Ago2[V966M]*) e seus controles (*Ago2[414]/TM3*). Moscas deficientes em hemócitos (*P{Hml-GAL4}/UAS-bacx*) e seus controles (*P{Hml-GAL4}/Cyo*) também foram utilizados nos experimentos de microinjeção. O reconhecimento das moscas mutantes foi feito por características fenotípicas que diferem mutantes heterozigotas (controles) e mutantes homozigotas.

4.4 Microinjeção em moscas

Para os procedimentos de injeção de vírus em moscas, utilizamos o microinjetor Nanoject II™ (Drummond©) na região intratorácica de cada indivíduo. Nos experimentos que realizamos mais de uma infecção, a segunda injeção foi realizada no lado oposto da região intratorácica da mosca. Anteriormente à injeção, anestesiávamos as moscas com CO₂ e as mantivemos sobre uma superfície com o fluxo contínuo do mesmo gás. A diluição de cada vírus para as injeções foi feita em meio *Schneider* não suplementado. Após cada experimento de microinjeção maceramos as

moscas individualmente no equipamento *Mini-BeadBeater-16* (Biospec©), procedendo com as extrações de RNA de cada amostra.

4.5 Preparação de dsRNA e tratamento em moscas

O dsRNA relativo ao VSV-GFP é complementar à sequência 427-962 do gene da nucleoproteína do vírus e o dsRNA relativo ao SINV-GFP é complementar a sequência 6738-6888 do gene nsp4 de SINV-GFP. Para a construção do dsGFP, sintetizamos iniciadores complementares às sequências 4863-5244 e 7797-8178 da proteína repórter de VSV-GFP e SINV-GFP respectivamente. Como controle de todos os experimentos com o tratamento de dsRNAs utilizamos a dsFluc correspondente à sequência de nucleotídeos entre 1206-1514 de *Firefly Luciferase*.

Os produtos de PCR correspondente às sequências de VSV e SINV foram utilizados como *template* para transcrição *in vitro* utilizando a enzima polimerase T7 para a geração de cada dsRNA (MEGAscript™ T7 Transcription Kit). Para a geração de dsRNA de GFP e de Fluc, além da transcrição *in vitro* com T7, também realizamos a transcrição com RNA polimerase SP6 (MEGAscript™ SP6 Transcription Kit). Os iniciadores utilizados para produção de dsRNAs estão descritos na tabela 1 (completar tabela). Utilizamos 150 nanogramas de cada dsRNA para injetar em cada mosca.

4.6 Extração de RNA e transcrição reversa

Realizamos a extração de RNA de célula e mosca individual pelo método de TRIzol® (Invitrogen™) a partir de um volume inicial de 200 µL do reagente. Todo o procedimento de extração foi feito conforme informado pelo protocolo do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada através da enzima Transcriptase Reversa M-MLV, com tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 2 µL de RNA total, 500 ng de Random Primers (iniciador randômico) ou 500 ng de Oligo DT primers (Anchored Oligo(dT)₂₀ Primer - Invitrogen™), 625 µM de dNTPs, 0,2 µM de DTT e água livre de nucleases (Ambion®) para volume de 20 µL.

4.7 Quantificação relativa de RNA

Para análise da expressão gênica e quantificação relativa da carga viral utilizamos a técnica de PCR quantitativo (qPCR) e qualitativo (PCR). As reações de qPCR foram feitas utilizando o método de SYBR® GREEN (Applied® Biosystems) através do equipamento QuantStudio 7 Flex™ RealTime PCR System (Applied® Biosystems). As reações consistem em: tampão da enzima (100 mM Tris pH 8,3; 500 mM KCl; 0,1 % Triton x100), 5 µL de cDNA, 193 µM de dNTPs, fluoróforo SYBR® GREEN (Applied® Biosystems), 2U da enzima Taq, 400nM de cada iniciador, descritos na tabela 2 e água livre de nucleases (Ambion®) para o volume final de 15 µL por reação. Realizamos as análises através do método $2^{-\Delta Ct}$ calculado em relação ao gene constitutivo Rpl32 (do inglês, *Ribosomal particle L32*).

Para as reações de PCR também seguimos o mesmo protocolo de qPCR descrito anteriormente, com exceção da presença de SYBR® GREEN em cada reação. Através da eletroforese em gel 2% corado com SYBR® SAFE (Applied® Biosystems), fizemos a análise do produto de PCR e quantificação qualitativa do DNA complementar de cada amostra.

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPadPrism 5.0 (Graphpad® Software) e para a avaliação dos dados, utilizamos o teste *t* de *Student* seguido de pós-teste de *Mann-Whitney*.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para qPCR e PCR

Iniciadores	Sequência (5'-3')
Rpl32	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG AAACGCGGTTCTGCATGAG
VSV	GGACATCCGGGGTAAGTTGG CGTCCAGGGCTTTCAAGGAT
SINV	CGTTCAGCTGCAAGACCA TACCGGCCGTGGCTAGTAT
GFP	CGACCACTACCAGCAGAACA TCTCGTTGGGGTCTTTGC
dsVSV	TAATACGACTCACTATAGGGTCGGATGCTTCCAGAACCAG TAATACGACTCACTATAGGGCAGAAGTGAAGGCAGGGTT
dsSINV	TAATACGACTCACTATAGGGGGTACCAGATGATGCCACC TAATACGACTCACTATAGGGAGTCCAGTGTGGCAGTTCA
dsGFP	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTGCACCA ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGGTTGTGGCGGATCTTGAAGT
dsFluc	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAACAATCCGGAAGCGACCAA ATTTAGGTGACACTATAGAAGTGTGACTGGCGACGTAATCCAC
VSV N-P	AATTGGACTTTTCAGCTCGTT CTTCAGCCTCTCACCATATCC
VSV P-M	CTTCAGCCTCTCACCATATCC GGTGTCCATCTCGTCAACTCC
VSV M-G	CCTATGATCTGGGATCAT GGATGGAATGTGTTATATACT
VSV-G-GFP	CAGTAGTTGAAAAGCTCTAT CATGTGGTCGGGGTAGCGGCT

VSV GFP-L	ACTACCAGCAGAACACCCCCA
	ATCCCAGTTCTTACTATCCA
DENV-1	TCGGAAGCTTGCTTAACGTAG
	TCCGTTGGTTGTTTCATCAGA

5. RESULTADOS

5.1 Efeito de uma infecção primária pelo VSV sobre infecções secundárias homóloga ou heteróloga em *Drosophila melanogaster*

Com o objetivo de avaliar se uma infecção primária pelo VSV poderia interferir sobre o estabelecimento de uma infecção viral secundária, nós utilizamos células S2 de *Drosophila* como modelo de infecção *in vitro*. Para isto, infectamos um grupo de células com VSV e dois dias após, infectamos o mesmo grupo celular com um VSV transgênico, capaz de expressar a proteína GFP (VSV-GFP). É importante ressaltar que usamos o vírus VSV-GFP para diferenciar as infecções, por se tratar de vírus homólogos. Dois dias após a segunda infecção, nós coletamos as células para o processamento de extração de RNA, quantificação da carga viral e expressão de GFP (figura 5A). Desta forma, a quantificação da expressão do gene GFP reflete a carga viral da segunda infecção.

Através da quantificação da expressão do gene L do VSV, verificamos a replicação viral entre as células infectadas com o vírus selvagem e o vírus transgênico (figura 5B). Ao quantificarmos a expressão de GFP referente a infecção secundária, observamos uma diminuição significativa da replicação do VSV-GFP em células previamente infectadas com VSV comparado com as células infectadas somente com o segundo vírus (figura 5C).

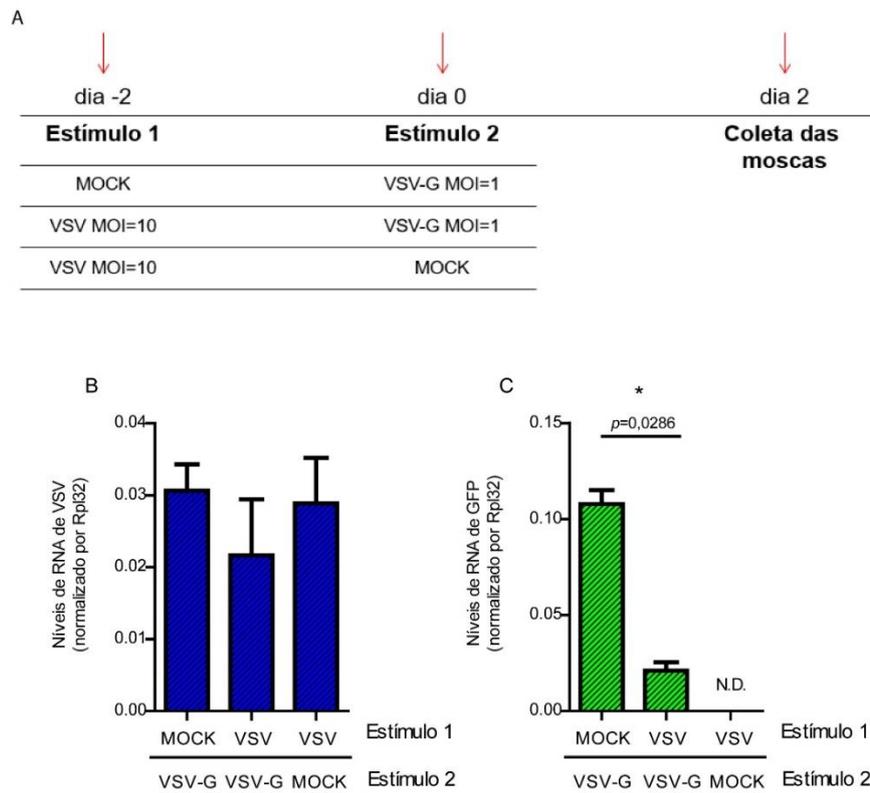


Figura 5: A infecção primária pelo VSV interfere com uma infecção secundária pelo mesmo vírus em células S2. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Células S2 foram infectadas com VSV (MOI=10) e dois dias após, foram infectadas com VSV-GFP (MOI=1). Paralelo a este grupo de infecção, dois outros grupos foram utilizados como controles do experimento: células somente infectadas com VSV-GFP, MOI=1 (MOCK+VSV-G) e células somente infectadas com VSV, MOI=10 (VSV+MOCK). Dois dias após o segundo estímulo, todos os grupos de células foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da carga viral pela expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. N.D. (não detectado) se refere à ausência de sinal da detecção de GFP. Valores de p significativos estão indicados no gráfico.

Para validar se o efeito de redução da carga viral após a primeira infecção pelo VSV é reprodutível *in vivo*, nós utilizamos moscas selvagens da linhagem *Canton S* para realizar as infecções. Para isto, nós coletamos moscas em tempos distintos após a infecção secundária com o objetivo de avaliar a cinética de replicação do VSV-GFP (figura 6A). Verificamos a replicação do VSV em todos os grupos de infecção (figura 6B). A infecção primária com o vírus selvagem induziu a diminuição significativa da replicação do VSV-GFP após dois e quatro dias de infecção, comparado aos grupos que não foram previamente expostos ao VSV (figura 6C). Apesar de não haver uma redução significativa da carga viral do VSV-GFP após seis dias de infecção, observamos uma tendência para o aparecimento deste efeito (figura 6C).

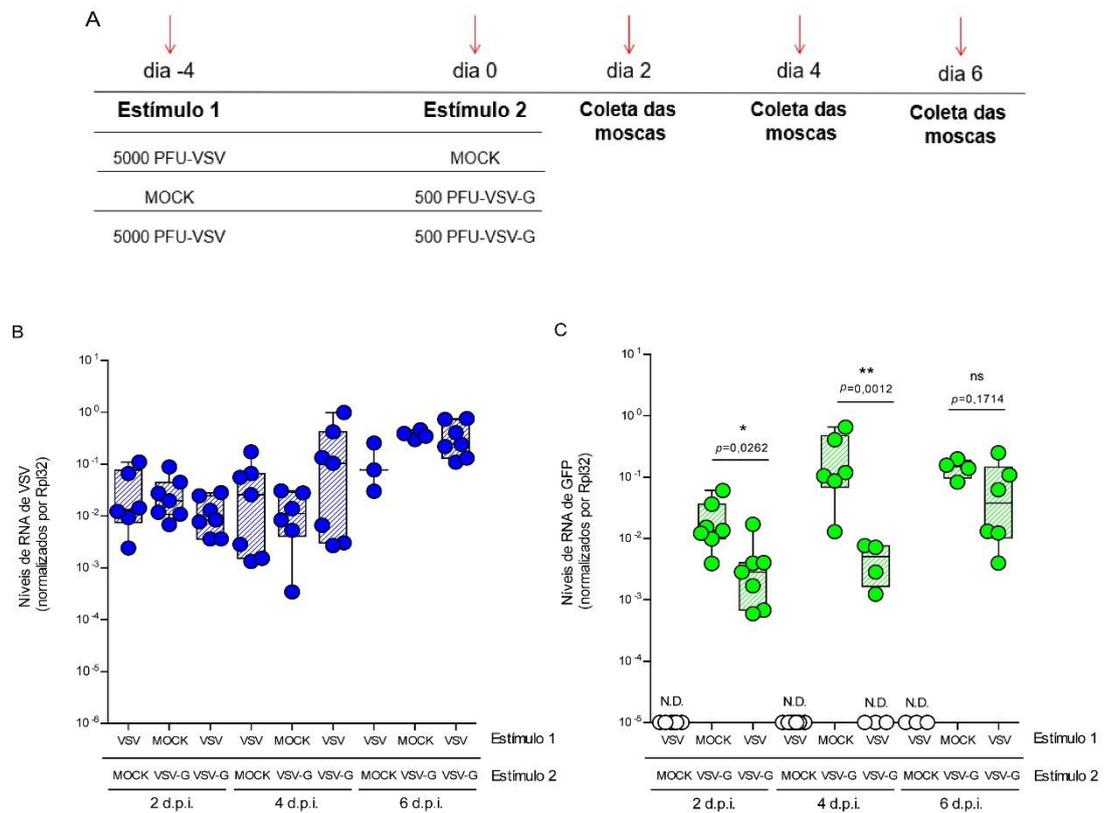


Figura 6: A infecção primária pelo VSV interfere uma infecção secundária pelo mesmo vírus em moscas selvagens. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram infectadas com 5000 PFU do VSV e quatro dias após foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP. Dois outros grupos foram criados como controles do experimento: um grupo somente infectado com 5000 PFU de VSV (VSV+MOCK) e outro grupo somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP (MOCK+VSV-G). Dois, quatro e seis dias após o segundo estímulo todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para GFP (N.D. - não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Os nossos resultados sugerem que a exposição das moscas a um vírus interfere diretamente sobre uma infecção secundária homóloga. Este efeito de interferência pode ser gerado por vários fatores, tanto viral quanto dependentes de mecanismos do hospedeiro. A fim de caracterizarmos o efeito de interferência observado, nós avaliamos se o mesmo fenômeno ocorreria em um modelo de infecção com vírus distintos. Para isso, utilizamos o VSV na infecção primária e o SINV na infecção secundária em células S2 (figura 7A). Além da quantificação da carga viral relativa ao SINV, também quantificamos a expressão de GFP uma vez que este vírus apresenta o genoma modificado com a presença da proteína repórter. Assim, a quantificação da expressão de GFP também reflete a carga viral do SINV.

Ao quantificarmos a carga viral do VSV, detectamos a sua replicação nas células expostas ao vírus (figura 7B). Observamos também o aumento significativo da expressão dos genes nsP2 e GFP, relativos ao SINV, entre o grupo de células previamente infectadas com o VSV, comparado ao grupo controle (figura 7C e 7D).

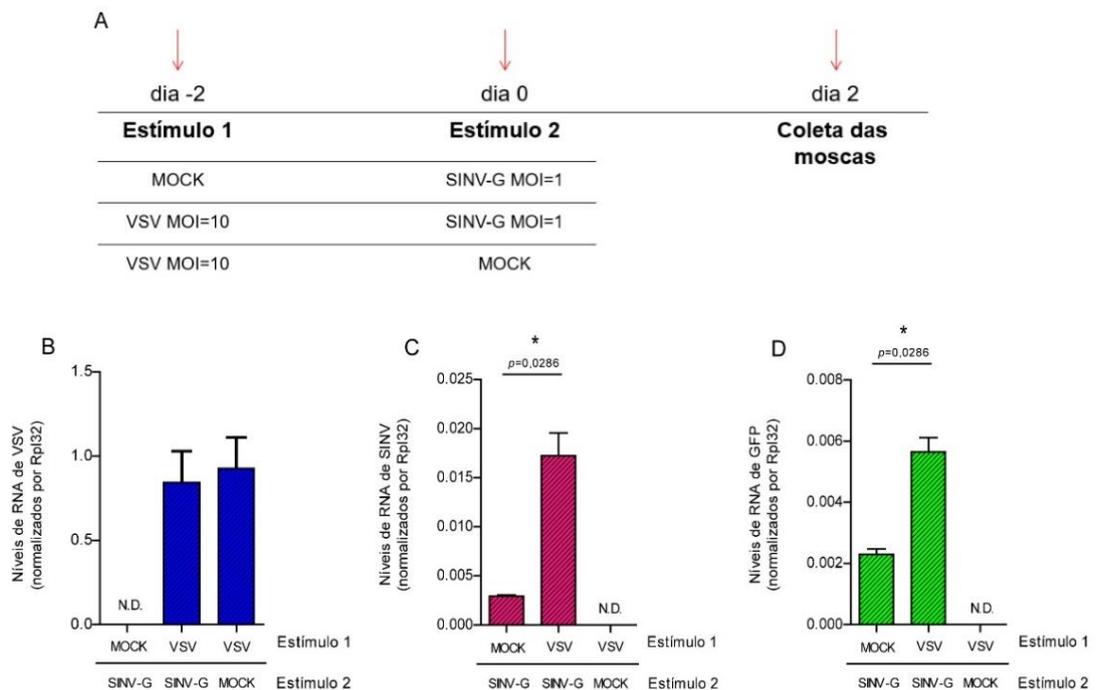


Figura 7: A infecção primária pelo VSV facilita uma infecção secundária pelo SINV em células S2. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Células S2 foram infectadas com VSV (MOI=10) e dois dias após foram infectadas com SINV-GFP (MOI=1). Paralelo a este grupo de infecção, dois outros grupos foram utilizados como controles do experimento: células somente infectadas com SINV-GFP, MOI=1 (MOCK+SINV-G) e outro grupo de células somente infectadas com VSV, MOI=10 (VSV+MOCK). Dois dias após o segundo estímulo, as células foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C) Quantificação da expressão do gene nsP2 de SINV entre os grupos de infecção. D) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. N.D. (não detectado) se refere à ausência de sinal da detecção por qPCR de VSV, SINV e GFP. Valores de p significativos estão indicados no gráfico.

Como a infecção primária pelo VSV interferiu positivamente sobre a replicação do SINV, nós utilizamos dois genótipos de moscas selvagens para analisar a interação entre vírus distintos *in vivo*. Neste experimento, além da infecção em moscas *Canton S*, também selecionamos moscas da linhagem *Oregon R* para realizar as infecções com o VSV e SINV (figura 8A). Pela quantificação da carga viral por PCR, certificamos a replicação do VSV em moscas expostas a este vírus (figura 8B). Neste modelo, não observamos diminuição nem aumento significativos da carga viral da segunda infecção pelo SINV em moscas *Canton S* previamente expostas ao VSV, comparadas ao grupo controle (figura 8C). Em moscas selvagens *Oregon R* nós observamos um aumento da replicação do SINV de forma similar ao observado em células S2 (figura 8C).

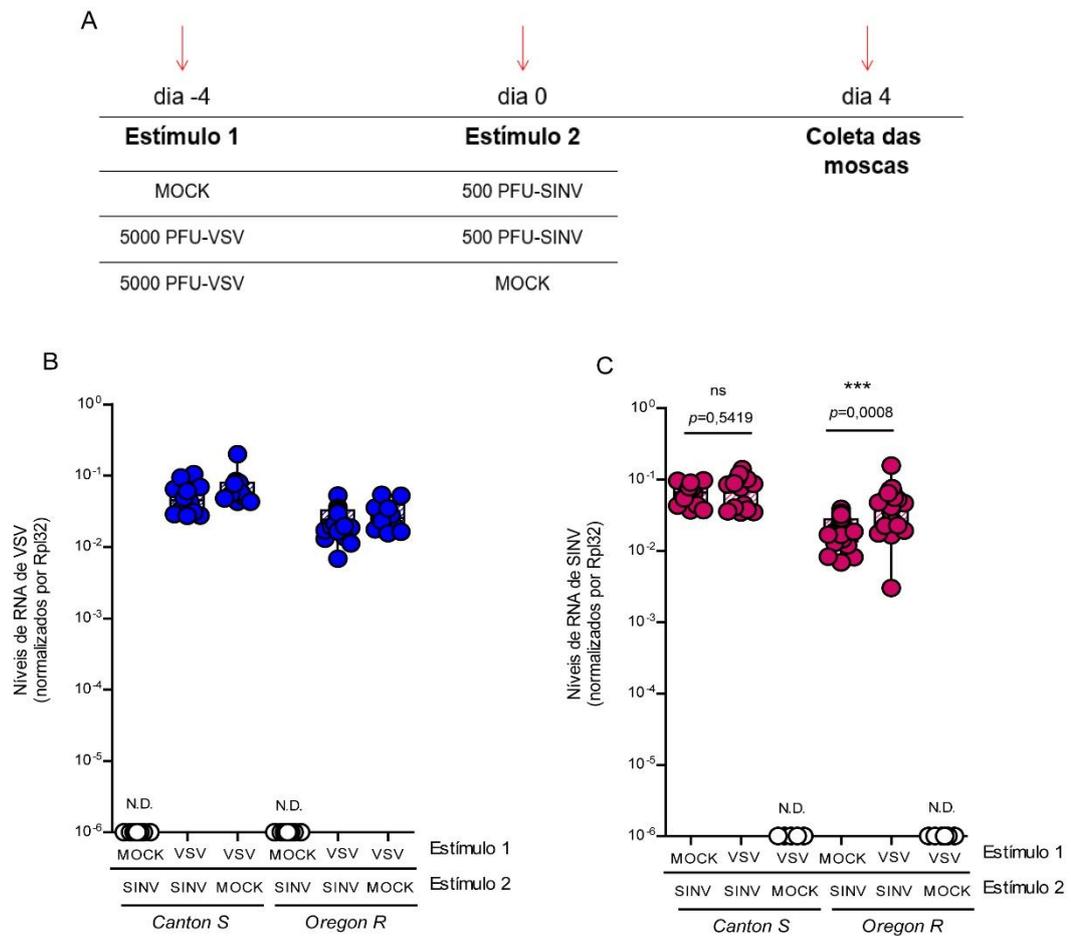


Figura 8: A infecção primária pelo VSV não afeta de maneira consistente uma infecção secundária heteróloga em moscas selvagens. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* e *Oregon R* foram infectadas com 5000 PFU do VSV e quatro dias após, foram infectadas com 500 PFU de SINV-GFP. Dois outros grupos foram criados como controle do experimento: um grupo de moscas somente infectado com 500 PFU de SINV-GFP (MOCK+ SINV-GFP) e outro grupo somente infectado com 5000 PFU de VSV (VSV+MOCK). Quatro dias após o segundo estímulo, todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C) Quantificação da expressão do gene nSP2 de SINV entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para VSV ou SINV (N.D. - não detectado). Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Nossos resultados sugerem que o efeito de interferência negativa de uma infecção viral primária sobre uma infecção secundária é vírus-específico, já que não houve a diminuição da replicação do SINV entre os grupos de moscas previamente expostas ao VSV. Em casos de vírus distintos, a infecção primária pelo VSV pode em alguns casos facilitar a infecção secundária pelo SINV como observamos em moscas *Oregon R* e em células S2.

5.2 Efeito da primagem de moscas selvagens por um vírus inativado sobre a infecção viral

Nossos resultados anteriores mostraram a existência de um efeito de interferência negativo gerado por uma infecção primária pelo VSV sobre uma infecção secundária homóloga em *Drosophila*. Este efeito poderia ser causado por um mecanismo de primagem imune antiviral ativado pela primeira infecção. Neste caso, a primeira infecção, ativaria mecanismos imunes no hospedeiro conferindo proteção da mosca contra a segunda infecção pelo mesmo vírus. Por outro lado, o efeito de interferência poderia ser um resultado direto de competição viral, onde o a replicação do primeiro vírus diminuiria recursos na célula infectada de forma a impedir a replicação do segundo vírus.

Para avaliar se a interferência induzida pela infecção primária é um efeito direto da competição viral ou dependente da ativação de mecanismos antivirais no hospedeiro, nós utilizamos um vírus inativado por raios ultra-violeta (VSV-UV). Neste caso, o vírus inativado perde a capacidade replicativa pela adição de dímeros de timina em seu genoma após a exposição à luz UV, mas mantém basicamente toda a estrutura e capacidade de penetração da partícula viral infectiva. O uso do vírus inativado nos permite avaliar se o efeito de interferência é independente da replicação viral. Assim, este primeiro estímulo seria uma primagem do sistema imune da mosca. A figura 9A mostra a estratégia utilizada neste experimento, onde o vírus inativado, VSV-UV, foi utilizado para a primagem das moscas e seguido pelo desafio com o vírus vivo (VSV-GFP).

No grupo de moscas previamente injetadas com o vírus inativado observamos um efeito inconsistente quanto a diminuição da replicação do VSV-GFP comparado ao grupo controle. A figura 9 mostra dois experimentos representativos desta

variabilidade. Em um deles, verificamos a redução significativa da carga viral do VSV-GFP após a primagem pelo VSV-UV enquanto em outro, houve a ausência de qualquer efeito da primagem com o vírus inativado (compare as figuras 9C e 9E). Em contraste, o efeito da interferência gerada pelo vírus vivo foi consistente em ambos os experimentos (figuras 9C e 9E). Nos dois experimentos nós observamos a completa ausência da replicação do vírus inativado, conforme esperado (figura 9B e 9D).

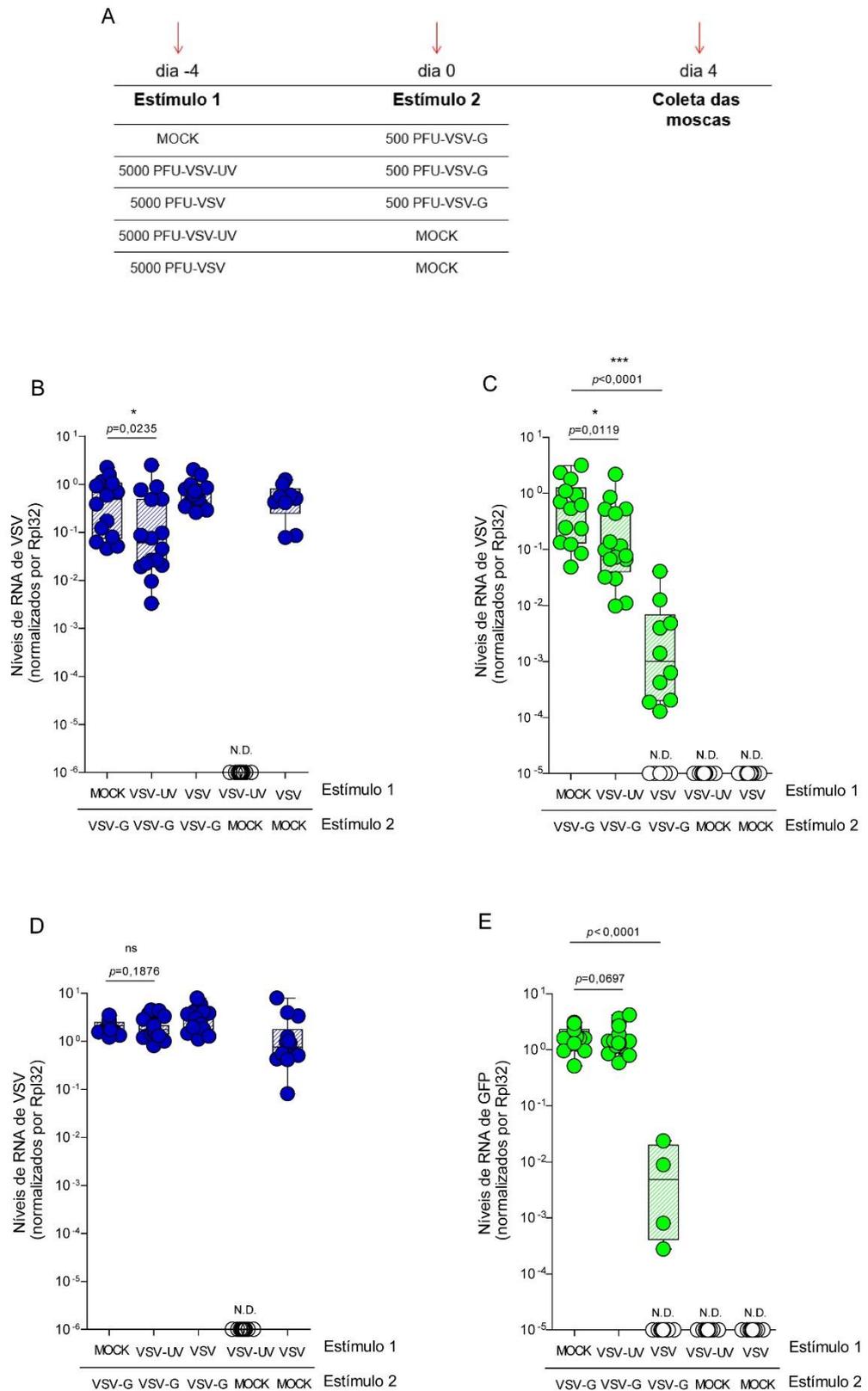


Figura 9: Efeito da primagem de moscas selvagens pelo VSV inativado por UV sobre uma infecção pelo mesmo vírus. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU do VSV-UV ou do VSV e quatro dias após ambos os grupos foram infectados com 500 PFU de VSV-GFP. Três outros grupos foram criados

como controle do experimento: um grupo de moscas somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP (MOCK+ VSV-GFP), outro grupo somente injetado com 5000 PFU VSV-UV (VSV-UV+MOCK) e outro grupo somente infectado com 5000 PFU de VSV (VSV+MOCK). Quatro dias após o segundo estímulo todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) e D) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C e E) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para VSV ou GFP (N.D. - não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Para avaliar se a primagem com outro vírus poderia ter um efeito mais consistente e significativo, nós avaliamos um modelo de infecção com o SINV (figura 10A). Neste caso, a primagem de moscas com o SINV inativado (SINV-UV) mostrou uma tendência oposta com relação à replicação do vírus. Nós verificamos o aumento significativo da replicação do SINV entre as moscas primadas com o SINV-UV, comparadas ao grupo controle (figura 10B).

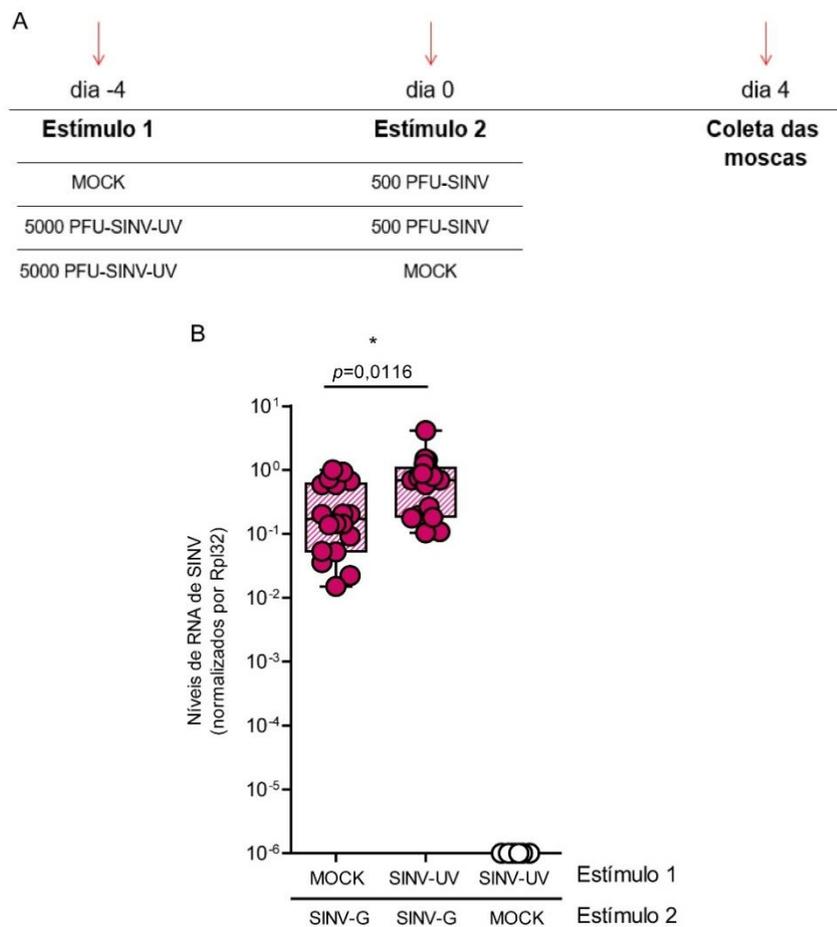


Figura 10: Efeito da primagem de moscas selvagens pelo SINV inativado por UV sobre uma infecção pelo mesmo vírus. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU do SINV-UV e quatro dias após foram infectadas com 500 PFU de SINV-GFP (SINV-UV+SINV-G). Dois outros grupos foram criados como controle do experimento: um grupo de moscas somente infectado com 500 PFU de SINV-GFP (MOCK+SINV-G) e outro grupo somente injetado com 5000 PFU SINV-UV (SINV-UV+MOCK). Quatro dias após o segundo estímulo todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene nsP2 de SINV normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para SINV. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s. se refere a valores de p não significativos.

Diante da inconsistência dos resultados com o vírus inativado, nós realizamos outros experimentos para testar diferentes condições que poderiam afetar o efeito gerado por este vírus. Nós testamos diferentes linhagens de moscas, temperaturas e tempos distintos de infecção além de variações das doses do vírus a serem utilizadas.

Para avaliar possíveis efeitos gerados pelo genótipo da mosca, utilizamos outras linhagens de moscas diferentes das *Canton S* utilizadas inicialmente. Para isto, além da utilização das moscas *Oregon R*, também selecionamos outro genótipo de moscas selvagens, a linhagem *w[1118]*. Em seguida procedemos com a injeção do VSV-UV seguida pelo desafio com o VSV-GFP (figura 11A). Nestes experimentos, verificamos que o primeiro estímulo com o vírus inativado não induziu à diminuição da replicação do VSV-GFP em ambas as linhagens de moscas, diferentemente do efeito gerado pelo vírus vivo (figura 11B).

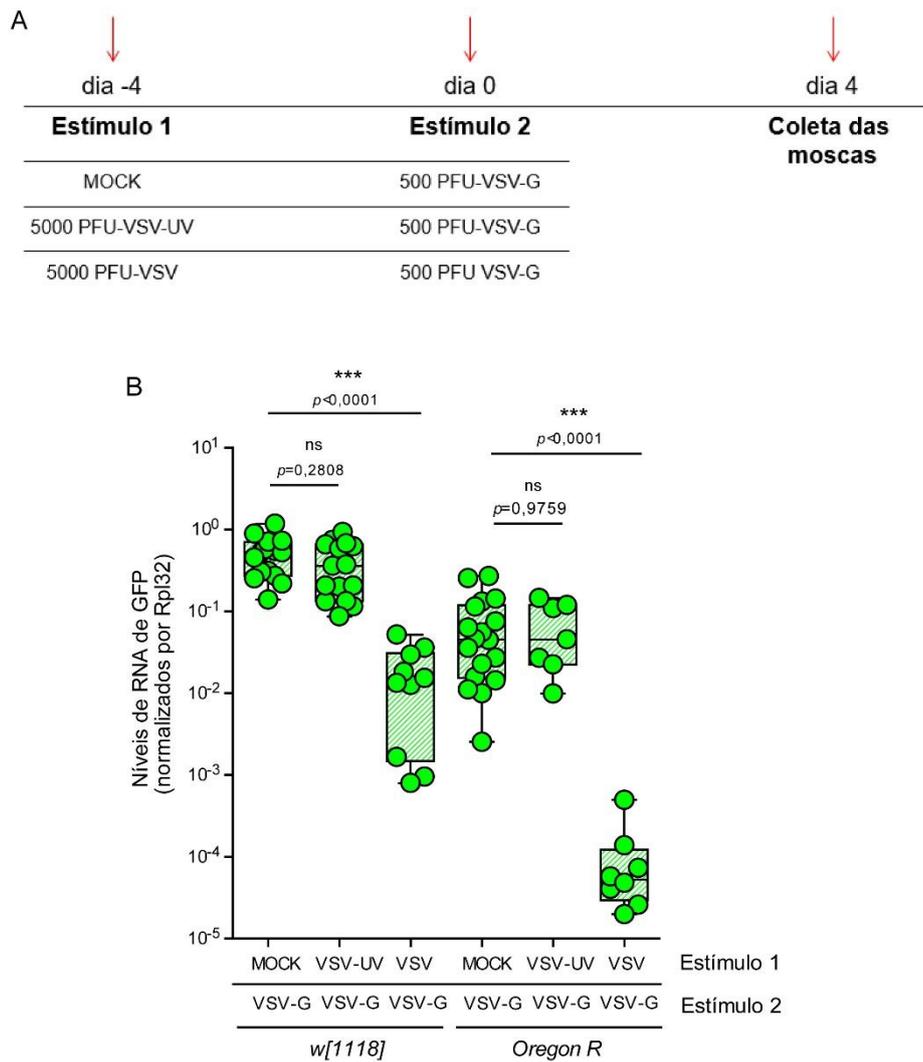


Figura 11: Análise do efeito de primagem pelo vírus inativado em diferentes genótipos de moscas selvagens. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens das linhagens *w[1118]* e *Oregon R* foram injetadas com 5000 PFU do VSV-UV ou do VSV e quatro dias após foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP. Um grupo somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle do experimento (MOCK + VSV-GFP). Após quatro dias de infecção, todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção, normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Valores de *p* significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de *p* não significativos.

Como não houve um efeito de primagem pelo vírus inativado em moscas selvagens das linhagens *w[1118]* e *Oregon R*, voltamos a utilizar a linhagem *Canton S* para testar variações em outros parâmetros que poderiam contribuir para a inconsistência dos resultados anteriores. Um destes parâmetros é a temperatura de manutenção das moscas infectadas. A temperatura ambiental é um fator que diretamente influencia no metabolismo de *Drosophila* (Berrigan and Partridge 1997) e poderia afetar o efeito de primagem. Para testar esta hipótese, nós variamos a temperatura de manutenção das moscas após a infecção com VSV-GFP, de 25°C já utilizada nos experimentos anteriores para 20°C (figura 12A). No entanto, não houve diferença significativa sobre a replicação do VSV-GFP após a primagem com o vírus inativado (figura 12B). Já a infecção primária pelo VSV inibiu significativamente a replicação do vírus da infecção secundária na temperatura testada (figura 12B).

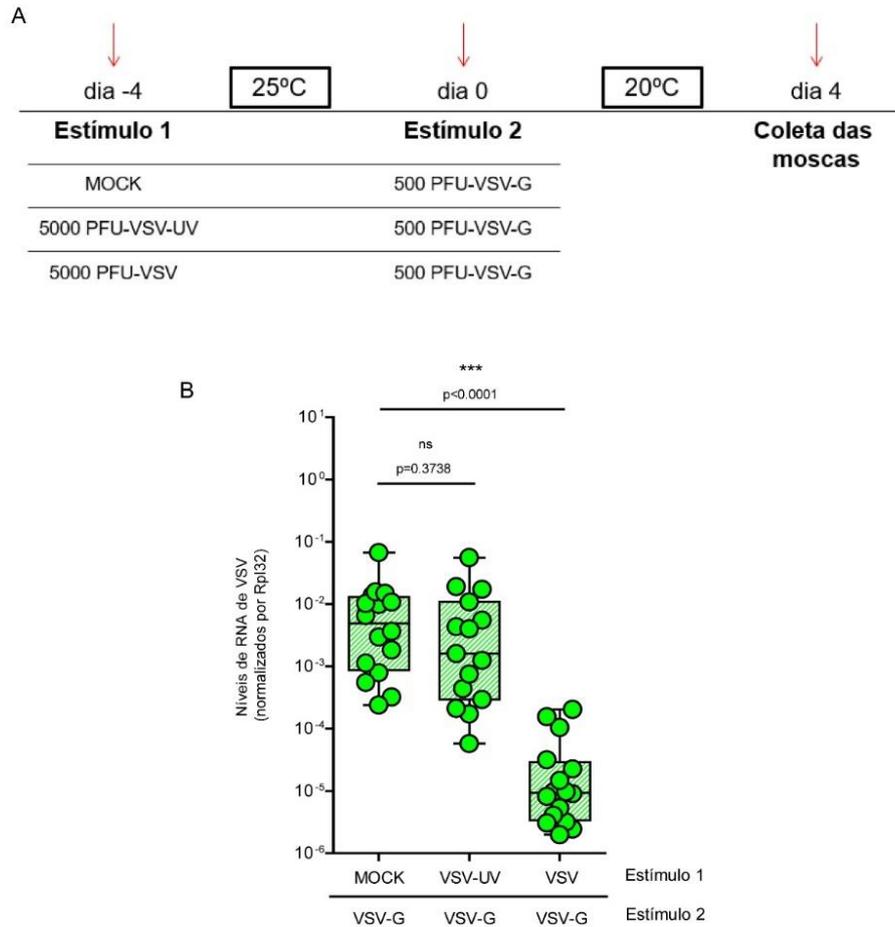


Figura 12: A influência da temperatura sobre o efeito de primagem pelo vírus inativado. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU do VSV-UV ou 5000 PFU do VSV e mantidas a 25°C. Quatro dias após a segunda infecção, as moscas foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP e mantidas a 20°C. Um grupo de moscas somente infectadas com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle do experimento (MOCK + VSV-GFP) e mantidas em na temperatura de 20°C. Após quatro dias de infecção, todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. B) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção, normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Valores de *p* significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de *p* não significativos.

Realizamos também uma cinética de replicação do VSV-GFP após a primagem com o vírus inativado para determinar se o tempo de infecção seria um fator determinante (figura 13A). Neste experimento, observamos a redução significativa da replicação do VSV-GFP entre o grupo de moscas previamente exposto ao VSV-UV após dois dias de infecção, mas não com quatro e oito dias infecção pelo VSV-GFP (figura 13B).

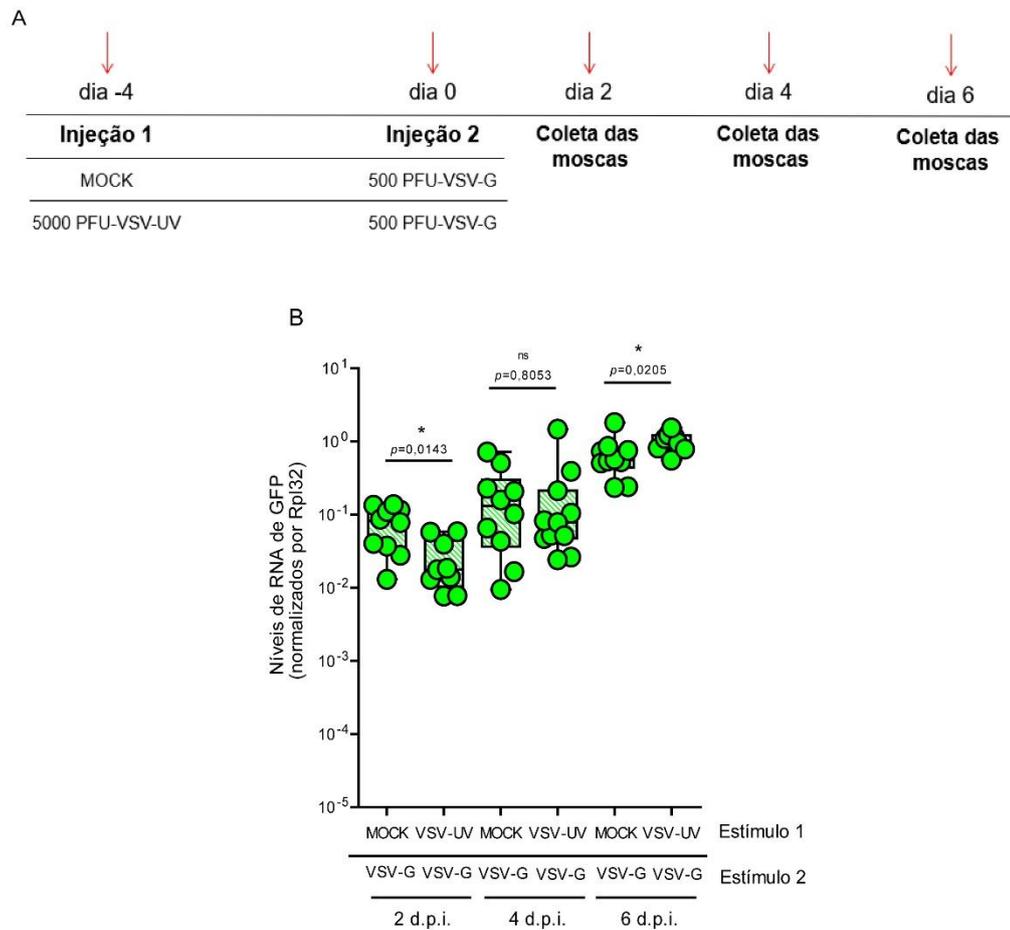


Figura 13: Cinética de infecção do VSV-GFP após a primagem pelo VSV inativado em moscas selvagens. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU de VSV-UV e quatro dias após foram infectadas com 500 PFU do VSV-GFP (VSV-UV+VSV-G). Um grupo de moscas somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle do experimento (MOCK-VSV-G). Três grupos distintos de indivíduos foram coletados com dois, quatro e seis dias após a infecção pelo VSV-GFP. B) Quantificação da expressão do gene GFP normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32* entre os grupos de infecção. Cada símbolo representa uma mosca individual. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

O tempo de infecção parece ser um fator que influencia no efeito de primagem. Nos tempos iniciais da infecção pelo VSV-GFP, o vírus ainda não atingiu a saturação da sua replicação e a primagem pelo VSV-UV poderia ser capaz de controlar a infecção pelo VSV-GFP. Para diminuir os efeitos gerados pelo excesso de vírus, diminuimos a dose do VSV-GFP, de 500 PFU para 100 PFU (figura 14A). Novamente, observamos variabilidade entre dois experimentos com doses distintas do VSV-GFP. Em um deles, verificamos que com a menor dose do VSV-GFP, a primagem pelo vírus inativado reduziu a sua replicação por aproximadamente dez vezes (figura 14B). No entanto, a réplica do experimento não mostrou o mesmo efeito gerado pelo vírus inativado, após a infecção com 100 PFU do VSV-GFP, onde não detectamos a diminuição da replicação viral (figura 14C). Em ambos os experimentos, a primagem com VSV-UV não diminuiu a replicação do VSV-GFP, após a infecção com 500 PFU do vírus. Em contraste, a prévia infecção o vírus vivo foi capaz de inibir significativamente a infecção com 100 e 500 PFU do VSV-GFP (figura 14B e 14C)

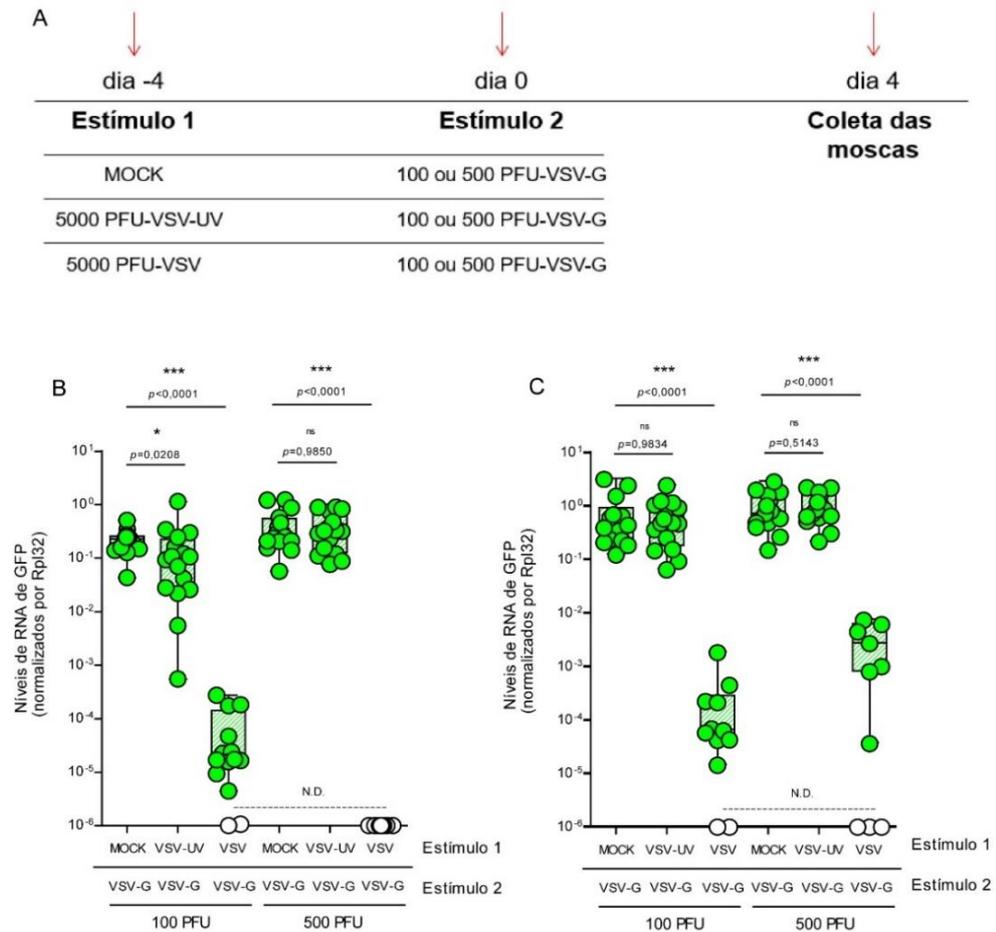


Figura 14: Efeito da primagem pelo VSV inativado em diferentes doses virais. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU do VSV-UV ou VSV e quatro dias após, foram infectadas com 500 ou 100 PFU de VSV-GFP. Dois outros grupos somente infectados com 100 ou 500 PFU de VSV-GFP foram criados como controle do experimento (MOCK + VSV-GFP). B) e C) Quantificação da expressão do gene GFP normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32* entre os grupos de infecção. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para GFP (N.D. - não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Diante da inconsistência dos resultados variando as doses de infecção com VSV-GFP, resolvemos testar doses distintas do VSV-UV (figura 15A). Nos experimentos descritos anteriormente, utilizamos 5000 PFU do VSV-UV para injetar em cada mosca. No entanto, ao aumentarmos a dose de primagem do vírus inativado para 50.000 PFU não verificamos a diminuição da replicação do VSV-GFP entre as moscas primadas, como seria esperado (figura 15B). Diferentemente, neste experimento, houve redução significativa da carga viral relativa ao VSV-GFP no grupo primados com a menor dose do VSV-UV, mostrando novamente uma inconsistência entre os experimentos.

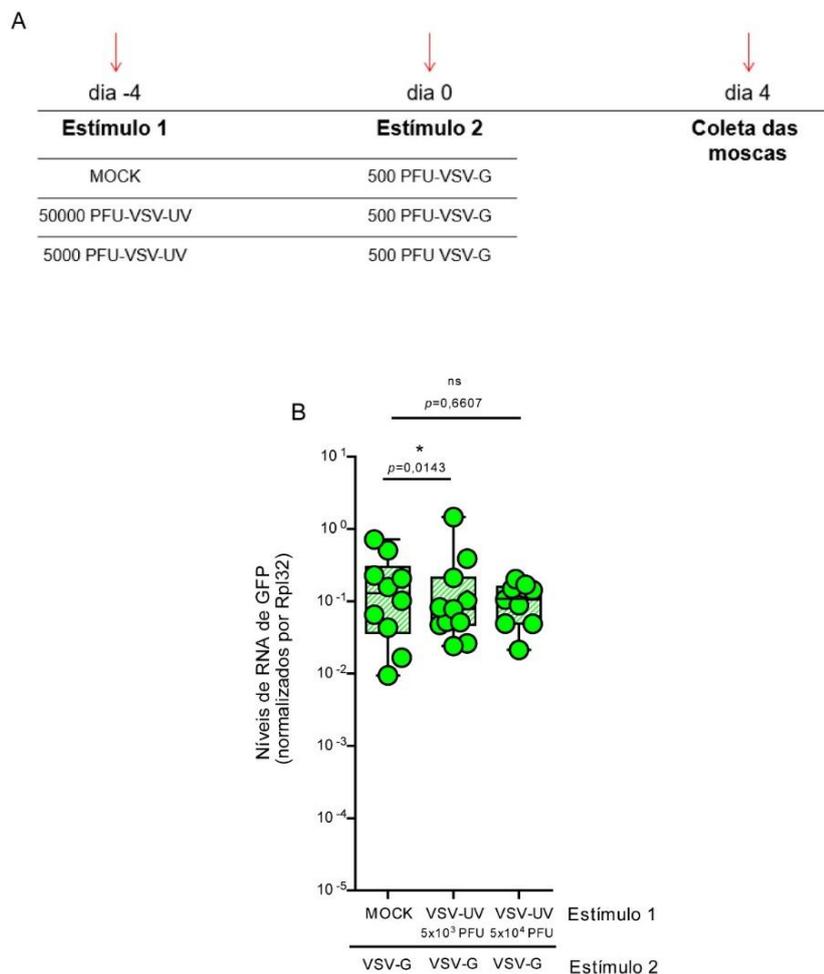


Figura 15: Efeito da dose do VSV inativado sobre a infecção homóloga pelo vírus vivo. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 5000 PFU ou 50.000 PFU do VSV-UV e quatro dias após os mesmos grupos foram infectados com 500 PFU de VSV-GFP. Um grupo somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle do experimento (MOCK + VSV-GFP). B) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. Cada símbolo

representa uma mosca individual. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Nossos resultados confirmam que a primagem pelo vírus inativado gera efeitos variáveis em diferentes condições. Para avaliar se o efeito poderia ser observado de forma mais consistente em outros organismos, nós decidimos avaliar um modelo de infecção sistêmica pelo DENV em mosquitos *Aedes aegypti*. Neste experimento, utilizamos, um isolado de DENV1 para a primagem com o vírus inativado seguido da infecção com o mesmo vírus vivo (figura 16A). Nós observamos um aumento significativo da carga viral de DENV1 entre os indivíduos previamente primados com o vírus inativado (figura 16B). Em nosso modelo, também testamos o efeito de primagem pelo SINV inativado (SINV-UV) sobre a infecção com o DENV1 (figura 16B). Nós observamos novamente um efeito oposto, onde a injeção com o SINV-UV induziu um aumento significativo da replicação do DENV1 (figura 16C).

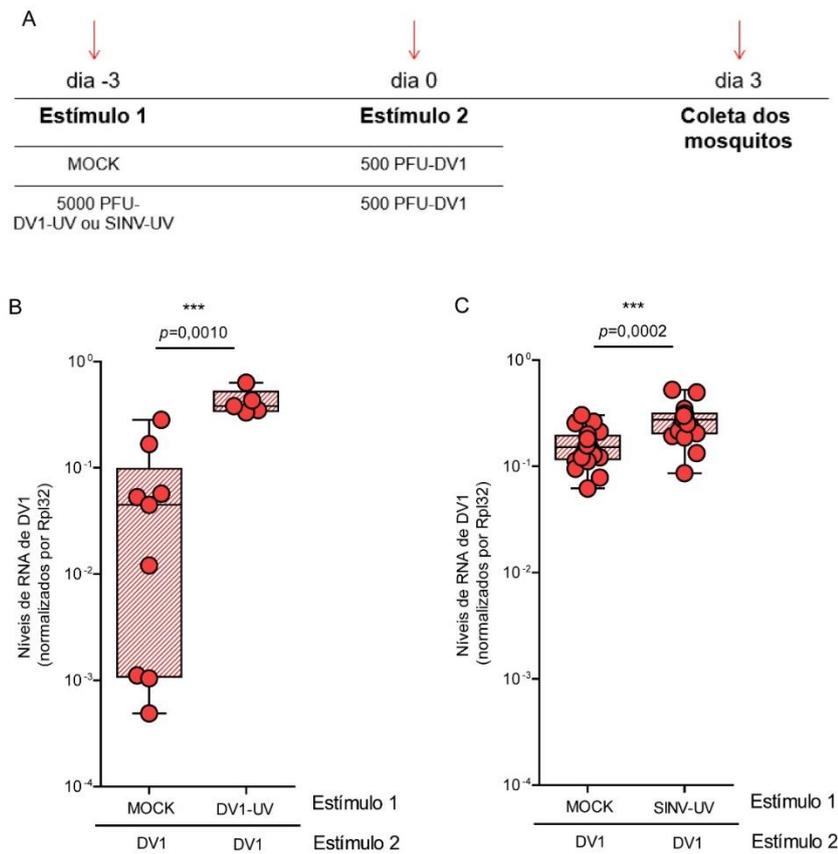


Figura 16: A primagem por um vírus inativado interfere positivamente sobre a replicação do DENV1 em mosquitos. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Mosquitos *Aedes aegypti* foram injetados com 5000 PFU de DENV1 inativado ou SINV inativado e quatro dias após foram infectados com 500 PFU de DENV1 (DV1-UV+DV ou SINV-UV+DV1). Quatro dias após a infecção viral todos os indivíduos foram coletados para o processamento de extração RNA. B) Quantificação da expressão do gene C de DENV1 entre os grupos de infecção. Cada símbolo representa um mosquito individual. Valores de p significativos estão indicados no gráfico.

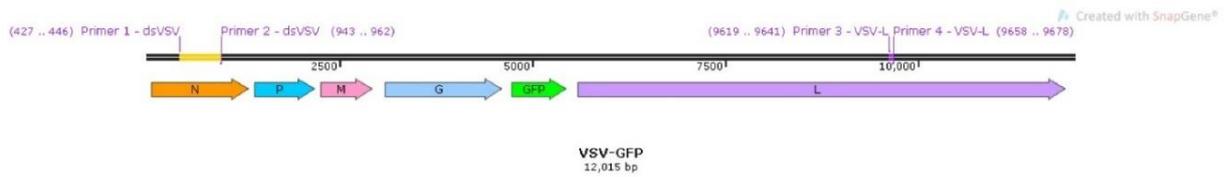
Nossos resultados sugerem que a primagem com um vírus inativado pode ter efeitos positivos e negativos sobre a replicação de um vírus vivo em diversos modelos testados. Em contraste, o efeito de interferência gerado pela infecção primária com o vírus vivo foi consistente em diferentes condições. Estes resultados sugerem que o efeito de interferência é dependente da replicação do primeiro vírus seja por competição direta ou por indução de um mecanismo antiviral dependente da replicação.

5.3 Avaliação dos efeitos do pré-tratamento de moscas com dsRNA contra o VSV sobre uma infecção viral.

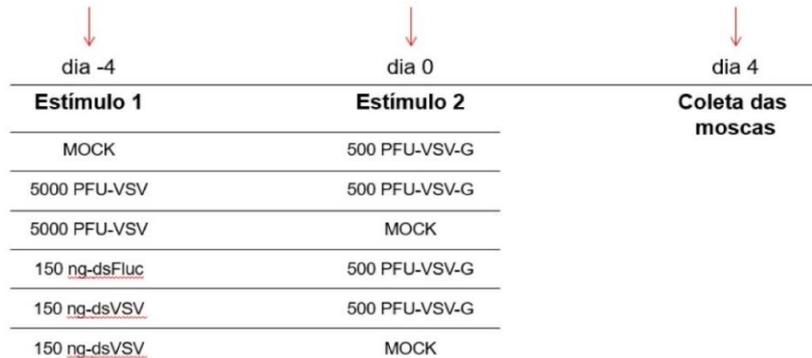
Um intermediário da replicação viral poderia ser o estímulo responsável pela primagem da resposta antiviral em moscas expostas a uma infecção primária. Assim, decidimos avaliar o efeito de moléculas de dsRNA, um intermediário da replicação viral, sobre a infecção pelo VSV. Diversos trabalhos na literatura demonstraram que o tratamento de moscas com dsRNA complementar a uma sequência viral é capaz de induzir proteção contra a infecção por vírus de RNA polaridade positiva como o DCV e SINV (Saleh, Tassetto et al. 2009, Tassetto, Kunitomi et al. 2017). No entanto, o efeito do tratamento de um dsRNA contra um vírus de genoma RNA com polaridade negativa como o VSV nunca foi testado.

Para testar se o dsRNA viral seria capaz de conferir proteção em nosso modelo, nós sintetizamos um dsRNA complementar à sequência do gene N do VSV, como tratamento prévio à infecção pelo VSV (figura 17A e 17B). Neste experimento também foi utilizado o vírus vivo para comparação dos efeitos gerados sobre replicação do VSV-GFP (figura 17B). Pela quantificação da carga viral utilizando primers que amplificam o gene L, observamos a redução significativa do VSV-GFP entre as moscas previamente tratadas com o dsVSV (figura 17C). Como o GFP é um gene repórter que reflete a replicação viral o tratamento prévio com o dsVSV reduziu significativamente a sua expressão, da mesma forma que o vírus vivo (VSV) interferiu (figura 17D) Assim, o dsRNA complementar a sequencias virais parece inibir a replicação do VSV da infecção de maneira similar ao vírus vivo.

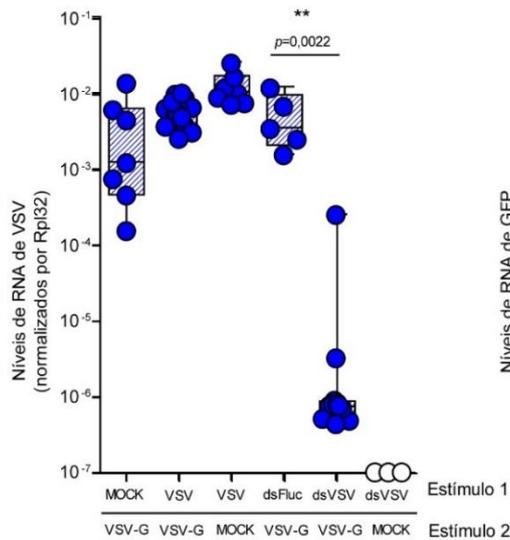
A



B



C



D

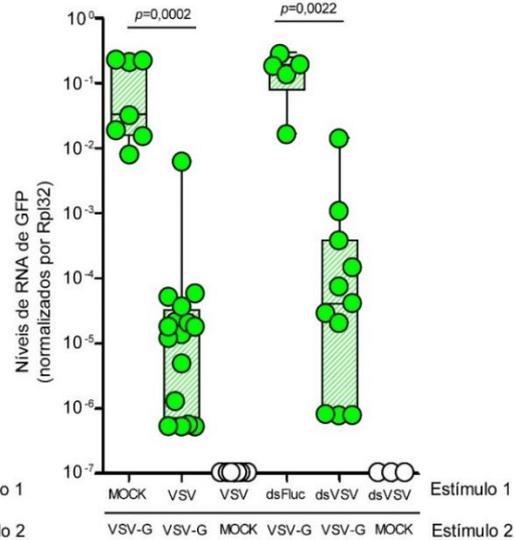


Figura 17: O tratamento com dsRNA complementar a sequências virais reduz a replicação do VSV de uma infecção subsequente. A) Mapa do genoma do VSV-GFP com os iniciadores utilizados para a geração de dsRNAs e para a detecção da carga viral por qPCR. Parte da sequência referente ao gene N do VSV (427-962) foi utilizada como molde para a construção de dsVSV (Primer 1 e Primer 2). Para a detecção da carga viral por qPCR, iniciadores foram desenhados na sequência do gene L (Primer 3 e Primer 4). B) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas da linhagem *Canton S* foram tratadas com 150 ng de dsVSV e quatro dias após, foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP (dsVSV+VSV-G). Como controle do experimento, um grupo de moscas foi tratado com a mesma quantidade de dsRNA relativo à *Firefly Luciferase* seguido da infecção por VSV-GFP (Fluc + VSV-G). 5000 PFU de VSV também foi utilizado como primeiro estímulo seguido da infecção com 500 PFU de VSV-GFP (VSV+VSV-G). Um grupo somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP foi utilizado como controle da carga viral da segunda infecção (MOCK+VSV-G). Quatro dias após a segunda injeção, todas as moscas foram coletadas para o processamento e extração de RNA. C) Quantificação

da expressão do gene L de VSV. D) Quantificação da expressão do gene GFP. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal da detecção por qPCR de VSV ou GFP (ND – não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de p significativos estão indicados no gráfico.

5.5 Mecanismo de primagem da via de siRNAs contra o VSV pelo tratamento com dsRNAs

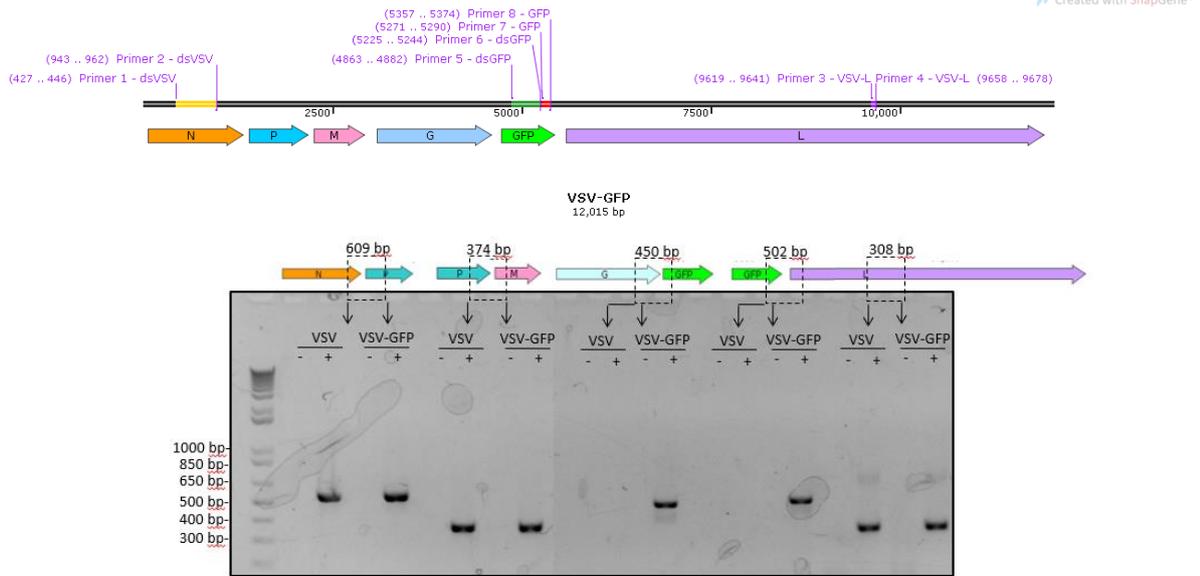
Nossos resultados sugerem que a geração de dsRNA como intermediário da replicação viral durante uma infecção primária poderia gerar interferência sobre uma infecção secundária homóloga. O dsRNA é presumivelmente processado pela via de siRNAs para geração de siRNAs que silenciariam RNAs virais no momento da infecção subsequente, como um mecanismo de primagem da via de RNA de interferência. Assim, decidimos investigar o mecanismo pelo qual a replicação viral seria inibida após o estímulo por um dsRNA complementar.

A atividade antiviral da via de siRNAs pode envolver o silenciamento de diferentes classes de RNA como o genoma viral ou mensageiros. Os trabalhos da literatura sugerem que os siRNAs poderiam silenciar diretamente o RNA genômico, no caso de vírus de RNA. No entanto, nosso grupo demonstrou que RNAs poliadenilados, presumivelmente os mensageiros, parecem ser os alvos preferenciais do silenciamento direto pela via de siRNAs (Marques, Wang et al. 2013). Desta maneira, nos propusemos a avaliar se os siRNAs gerados pelo processamento do dsRNA com sequências virais seriam capazes de silenciar diretamente o genoma viral ou somente os RNAs mensageiros produzidos durante a infecção pelo VSV.

Como estratégia experimental, além da utilização do dsRNA complementar ao gene N do VSV, também construímos um dsRNA complementar ao gene GFP (dsGFP) que está inserido no genoma do VSV entre os genes G e L do vírus (figura 18A). Como o GFP não é um gene essencial para o vírus e caso o tratamento com dsGFP venha a afetar a replicação do VSV-GFP, estes resultados seriam um indicativo que os siRNAs estariam silenciando diretamente o genoma viral. A figura 18B exemplifica a estratégia experimental do tratamento com os dsRNAs e a posterior infecção com VSV-GFP em moscas selvagens. Verificamos que o tratamento com o dsVSV reduziu os níveis de replicação do VSV, quantificado pela expressão do gene

L viral, em aproximadamente cem vezes (figura 18C). Entretanto, não observamos redução significativa na carga viral do VSV-GFP entre o grupo de moscas previamente tratado com o dsGFP (figura 18C).

A



B

dia -4	dia 0	dia 4
Injeção 1	Injeção 2	Coleta das moscas
150 ng-dsFluc	500 PFU-VSV-G	
150 ng-dsVSV	500 PFU-VSV-G	
150 ng-dsGFP	500 PFU-VSV-G	

C

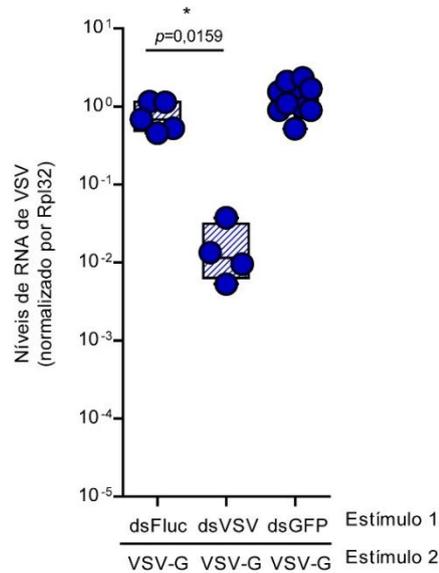


Figura 18: O processamento do dsRNA induz à degradação de RNAs virais da infecção por VSV.
 A) PAINEL ACIMA: MAPA DO GENOMA DO VSV-GFP COM OS INICIADORES UTILIZADOS PARA A GERAÇÃO DOS dsRNAs E PARA A DETECÇÃO DA CARGA VIRAL POR qPCR. PARA A CONSTRUÇÃO DE dsGFP, FORAM DESENHADOS

iniciadores complementares às sequências de nucleotídeos entre 4863 e 5244 de GFP (Primer 5 e Primer 6). Para a sua detecção por qPCR, foram desenhados iniciadores entre as sequências 5271-5374 do mesmo gene (Primer 7 e 8). Painel abaixo: PCR qualitativo para a determinação da posição de GFP no genoma de VSV através da amplificação das junções das sequências das proteínas G e GFP (G-GFP) e GFP e polimerase (GFP-L). Como controle negativo, foi utilizado o VSV selvagem. B) Desenho experimental da estratégia de tratamento com dsRNAs. Moscas selvagens da linhagem *Canton S* foram injetadas com 150 ng de dsVSV ou dsGFP e 4 dias após foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP. Como controle, um grupo de moscas foi injetado com 150 ng de dsFluc seguido da infecção por VSV-GFP. Quatro dias após a infecção, todas as moscas foram coletadas para o processamento de extração de RNA. C) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção normalizada pela expressão do gene constitutivo *RpL32*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Valores de *p* significativo está indicado no gráfico.

Em seguida realizamos um experimento para avaliar a cinética de replicação do VSV-GFP após o tratamento com dsVSV ou dsGFP (figura 19A). Verificamos que o tratamento com o dsVSV complementar à sequência do gene N induziu a diminuição significativa da expressão do gene L após dois, quatro e oito dias de infecção (figura 19B). O seu tratamento também reduziu significativamente a expressão do gene GFP com dois e quatro dias de infecção (figura 19C). A redução da expressão do gene L pelo tratamento com o dsVSV foi menor com oito dias de infecção comparado ao efeito em tempos mais precoces de infecção (figura 19B). Já a expressão de GFP após oito dias de infecção não foi reduzida no mesmo tempo de infecção após o tratamento com dsVSV (figura 19C). Estes resultados sugerem que o efeito do dsRNA é dependente do tempo da infecção e que, eventualmente, o vírus é capaz de escapar o silenciamento.

Em contraste com o dsVSV, o tratamento de moscas com o dsGFP não inibiu a replicação viral medida pelos níveis de expressão do gene L de VSV em todos os tempos de infecção (figura 19B). O dsGFP parece favorecer a infecção viral, com dois dias de infecção, onde há um aumento significativo da carga viral entre os indivíduos previamente tratados com o dsGFP (figura 19B). Estes resultados reforçam a ideia que o dsGFP não é capaz de inibir a infecção viral e poderia ainda competir pelo maquinário da via de siRNAs de forma a favorecer a replicação do vírus.

Apesar de não afetar a replicação viral, o dsGFP deveria pelo menos agir sobre o transcrito de GFP separadamente. No entanto, não observamos efeito do dsGFP nem mesmo sobre a expressão do gene repórter (figura 19C). O VSV é um vírus de polaridade negativa que possui muitas espécies de RNA virais em células infectadas: o genoma de polaridade negativa, o antígenoma de polaridade positiva e os transcritos virais. A nossa estratégia de detecção dos RNAs utiliza iniciadores randômicos que não diferenciam os tipos de RNA viral. Assim, mesmo que os transcritos de GFP tenham sido silenciados, eles representam uma porcentagem pequena em relação aos RNAs virais totais, principalmente ao genoma de polaridade negativa.

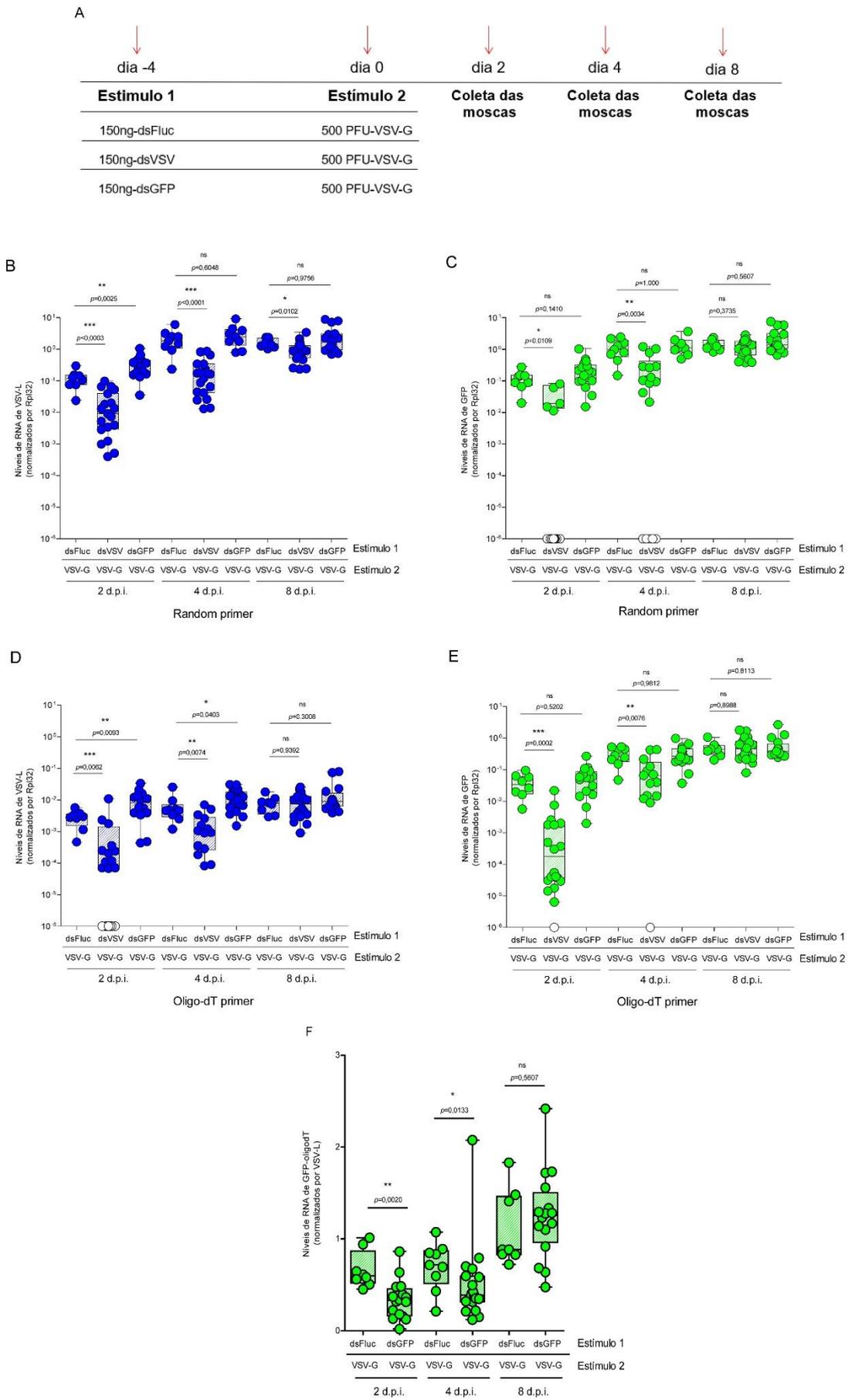


Figura 19: Cinética de replicação viral após o tratamento com dsRNAs complementares a sequências de VSV. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas da linhagem *Canton S* foram tratadas com 150 ng de dsVSV ou dsGFP e quatro dias após, foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP (dsVSV+VSV-G). Como controle do experimento, um grupo de moscas foi tratado com a mesma quantidade de dsRNA relativo à *Firefly Luciferase* seguido da infecção por VSV-GFP (Fluc + VSV-G). Dois, quatro ou oito dias após a infecção, todas as moscas foram coletadas para o processamento e extração de RNA. B) e D) Quantificação da expressão do gene L de VSV entre os grupos de infecção. C) e E) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção. Em B) e C) Reações de RT-qPCR realizadas com *primers* randômicos. Em D) e E) Reações de RT-qPCR realizadas com *primers* de oligo-dT. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. F) Quantificação da expressão do gene GFP normalizada pela expressão do gene L de VSV. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal da detecção por qPCR de GFP (ND – não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de *p* significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de *p* não significativos.

Para quantificar preferencialmente os transcritos virais, nós utilizamos um primer de oligo-dT para síntese do cDNA, uma vez que o genoma do VSV não é poliadenilado. Observamos a redução significativa da expressão dos genes L e GFP entre o grupo de moscas previamente tratadas com o dsVSV após dois e quatro dias de infecção, mas não com oito dias de infecção (figura 19D e 19E). Embora o dsVSV seja complementar à sequência do gene N do vírus, o seu processamento parece interferir indiretamente na produção dos transcritos referentes a L e GFP, já que a expressão do gene N é essencial para a replicação e transcrição dos genes virais.

Em relação ao tratamento com o dsGFP, não houve inibição da expressão do gene L do VSV entre as moscas previamente tratadas em todos os tempos de infecção, após as reações com oligo-dT (figura 19D). Novamente, houve o efeito positivo sobre a infecção viral, onde observamos o aumento significativo da expressão do gene L após o tratamento com o dsGFP com dois e quatro dias de infecção (figura 19D). Verificamos também que não houve redução da expressão de GFP após o tratamento com dsGFP, mesmo nas reações com o primer de oligo-dT (figura 19E).

Em nossas análises, normalizamos a quantificação da expressão de cada gene viral pela expressão de um gene expresso constitutivamente na mosca, o *Rpl32*. É presumível que seus níveis de expressão sejam constantes, independentemente da condição de infecção. Diferentemente, os genes virais, como o gene L, somente serão expressos após a infecção do vírus na célula, podendo variar os seus níveis de expressão ao longo da cinética de infecção. Para melhor visualizar o efeito gerado pelo dsGFP sobre o seu próprio transcrito, nós normalizamos os níveis de expressão do gene GFP pelos níveis de expressão do gene L de VSV, já que este gene é expresso durante a infecção viral, mas não é afetado pelo dsGFP. Nesta análise foi possível observar melhor a interferência gerada pelo dsGFP sobre a transcrição do seu próprio gene, onde detectamos a redução significativa da expressão de GFP viral após dois e quatro dias de infecção (figura 19F). Com oito dias de infecção, não houve o silenciamento, provavelmente pelo excesso da replicação viral, como observado nos resultados anteriores.

Para confirmar a eficiência do dsGFP na ausência de diversos tipos de RNAs virais que poderiam dificultar a análise, nós injetamos o dsRNA em moscas que expressam GFP sobre o controle de um promotor específico de hemócitos (*hml-delta-*

GAL4, UAS-GFP). Como demonstrado na figura 20, houve a diminuição significativa da expressão de GFP entre o grupo de moscas tratado com o dsGFP, comparado ao grupo controle, confirmando que o dsGFP é funcional e induz o silenciamento do seu próprio gene.

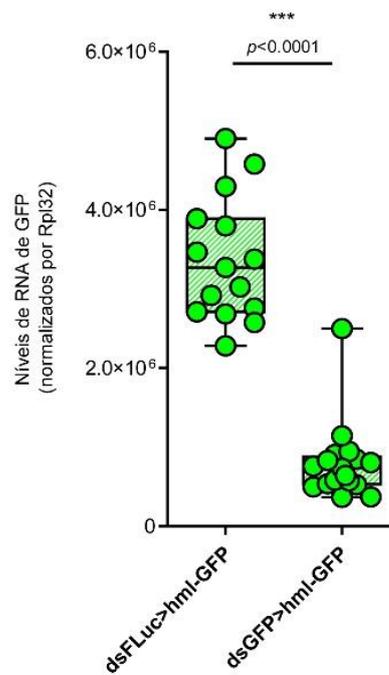


Figura 20: O dsRNA complementar ao GFP silencia a produção endógena do gene *in vivo*. Moscas do genótipo *hml-delta-GAL4, UAS-GFP* foram injetadas com 150 ng de dsGFP ou dsFLuc. Três dias após a injeção, todas as moscas foram coletadas para a extração de RNA e análise da expressão de GFP normalizada pela expressão de *Rpl32*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Valor de *p* significativo está indicado no gráfico.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o RNA genômico do vírus não é alvo direto da ação dos siRNAs. O aumento do tempo de infecção e conseqüentemente a saturação da replicação do vírus parecem ser fatores determinantes na durabilidade do efeito gerado pelo tratamento com um dsRNA.

5.6 Mecanismo de primagem da via de siRNAs contra o SINV após o tratamento com dsRNAs

Os resultados anteriores sugerem que os transcritos virais são preferencialmente os alvos da ação dos siRNAs gerados pelo processamento de um dsRNA. Para validar esta hipótese, nós utilizamos o SINV que apresenta uma estratégia de replicação diferente do VSV. O genoma do SINV é fita simples de RNA com polaridade positiva que é poliadenilado e pode agir diretamente como RNA mensageiro. Na fase inicial da infecção, as proteínas não estruturais (nsP1234) são produzidas a partir do genoma viral e formam o complexo replicativo que sintetiza o antígeno de polaridade oposta para a síntese dos RNAs genômicos e subgenômicos. O subgenoma de RNA é sintetizado a partir da região 3' do genoma viral, agindo como um RNA mensageiro para a tradução das proteínas estruturais do vírus.

Em nosso modelo, sintetizamos um dsRNA complementar à sequência gênica da proteína nsP4, a RdRp viral. Utilizamos também o dsRNA complementar ao GFP (dsGFP), uma vez que o SINV é recombinante e expressa o gene repórter a partir de um RNA subgenômico extra (figura 21A). Como no caso do VSV, o GFP não é essencial para a replicação do SINV e o tratamento com o dsGFP só afetaria a sua replicação caso o próprio genoma viral fosse silenciado. Assim realizamos uma cinética de replicação viral após o tratamento com cada dsRNA, para avaliar a sua capacidade em inibir a replicação do SINV (figura 21B).

Ao quantificarmos os níveis de expressão do gene nsP2, verificamos a sua redução significativa entre os grupos de moscas previamente tratadas com o dsSINV, após dois, quatro e oito dias de infecção (figura 21C). Para confirmar o efeito do dsSINV, analisamos também a expressão do RNA subgenômico que codifica os genes estruturais e observamos uma redução significativa com dois dias de infecção (figura 21D). Similar ao efeito do dsGFP sobre o VSV-GFP, este dsRNA não interferiu

sobre a expressão de nsP2 após dois e quatro dias de infecção embora tenha induzido uma diminuição com oito dias (figura 21C).

Figura 21: Cinética de replicação viral após o tratamento com dsRNAs complementares a sequências de SINV. A) Mapa do genoma do SINV-GFP com os iniciadores utilizados para a geração de dsRNAs e para a detecção da carga viral por qPCR. Para a construção de dsSINV, foram desenhados iniciadores complementares às sequências de nucleotídeos entre 5920-6424 de SINV-GFP (Primer 1 e Primer 2). Para a sua detecção por qPCR foram desenhados iniciadores complementares às sequências 3097-3162 (Primer 3 e Primer 4) e 11101-11242 (Primer 5 e Primer 6). Para a construção de dsGFP foram desenhados iniciadores complementares à sequência 7797-8178 (Primer 7 e Primer 8). Para a sua detecção por qPCR foram desenhados iniciadores complementares às sequências de nucleotídeos entre 8205-8308 (Primer 9 e Primer 10). B) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas da linhagem *Canton S* foram tratadas com 150 ng de dsSINV ou dsGFP e quatro dias após, foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP (dsSINV+SINV-G). Como controle do experimento, um grupo de moscas foi tratado com a mesma quantidade de dsRNA relativo à *Firefly Luciferase* seguido da infecção por VSV-GFP (dsFluc + SINV-G). Dois, quatro ou oito dias após a infecção, todas as moscas foram coletadas para o processamento e extração de RNA. C) Quantificação da expressão do gene nsP2 de SINV entre os grupos de infecção. D) Quantificação da expressão do gene sP de SINV entre os grupos de infecção. E) Quantificação da expressão de GFP entre os grupos de infecção. As quantificações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. F) Quantificação da expressão de GFP normalizada pela expressão do gene nsP2 de SINV. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal da detecção por qPCR de GFP (ND – não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de p não significativos.

Em seguida avaliamos os níveis dos transcritos de GFP e observamos a redução significativa entre o grupo de moscas previamente tratadas com dsGFP após dois e quatro dias de infecção (figura 21E). A capacidade de observamos o efeito do silenciamento direto do GFP expresso pelo SINV é devido ao fato que o gene repórter é expresso a partir de um subgenoma independente. Este RNA age diretamente como um RNA mensageiro e é encontrado em maior abundância que o RNA genômico. Assim, é possível observar o silenciamento do RNA subgenômico mesmo que não haja efeito sobre o RNA genômico do vírus que também contém a sequência de GFP.

Para corroborar os resultados anteriores, normalizamos os níveis da expressão de GFP sobre os níveis da expressão de nsP2, gene que não é afetado pelo tratamento com dsGFP. Nesta análise, observamos novamente a redução significativa da expressão de GFP após dois e quatro dias de dias de infecção entre as moscas tratadas com o seu dsRNA (figura 21F). Assim, o dsGFP foi capaz de silenciar o RNA subgenômico específico, mas provavelmente não o RNA genômico e, por isto, não teve efeito sobre outros RNAs virais como nsP2 e sP nos tempos precoces de infecção. Logo, os siRNAs gerados pelo processamento do dsRNA parecem silenciar preferencialmente os RNAs mensageiros virais.

5.7 O papel de componentes de mecanismos antivirais no controle da infecção secundária pelo VSV em moscas expostas a uma infecção primária homóloga

O dsRNA complementar a sequencias virais induziu a diminuição da replicação do VSV de maneira similar à exposição prévia ao vírus vivo. Assim, o efeito da exposição das moscas ao primeiro vírus sobre uma infecção secundária poderia ser mediado pela geração de dsRNA como intermediário da replicação viral. O dsRNA é o principal ativador da via de siRNAs, ao ser reconhecido e clivado pela enzima Dcr-2, gerando pequenos RNAs que são carregados na nucleasse AGO2 que irá silenciar alvos cognatos (de Faria, Olmo et al. 2013). Uma demonstração da importância da via de siRNAs para a resposta antiviral é a susceptibilidade de moscas deficientes para Dcr-2 e AGO2 à infecção viral (Galiana-Arnoux et al., 2006; Rij et al., 2006; Wang et al., 2006).

Trabalhos de vários grupos incluindo o nosso, demonstraram que a infecção por VSV induz a produção de siRNAs provindos de dsRNA gerados durante a replicação do vírus (Marques et al., 2013; Mueller et al., 2010). Assim, o dsRNA poderia ser o principal responsável pelo efeito de interferência gerado por uma infecção primária ao ser reconhecido pela via de siRNAs para gerar os siRNAs virais que silenciariam sequências complementares de RNA do vírus da infecção secundária. Para avaliar se a via de siRNAs seria necessária para o efeito de interferência de uma infecção primária, nós utilizamos moscas deficientes em Dcr-2 e AGO2, componentes centrais da via (figura 22A). Entre o grupo de moscas controle, observamos a redução significativa da carga viral relativa à infecção secundária, pela expressão de GFP, corroborando os resultados anteriores em moscas selvagens (figura 22B). Em moscas deficientes para Dcr-2, nós observamos uma redução ainda maior da carga viral referente a infecção secundária onde a maioria dos indivíduos apresentou níveis abaixo do detectável da expressão de GFP (figura 22B). Observamos resultados muito similares em moscas deficientes para AGO2 onde novamente detectamos um efeito de interferência exacerbado sobre a replicação VSV-GFP após a infecção primária pelo VSV (figura 22C). Assim, a infecção prévia pelo VSV inibe significativamente com a replicação de um vírus durante uma infecção secundária de forma independente da via de siRNAs.

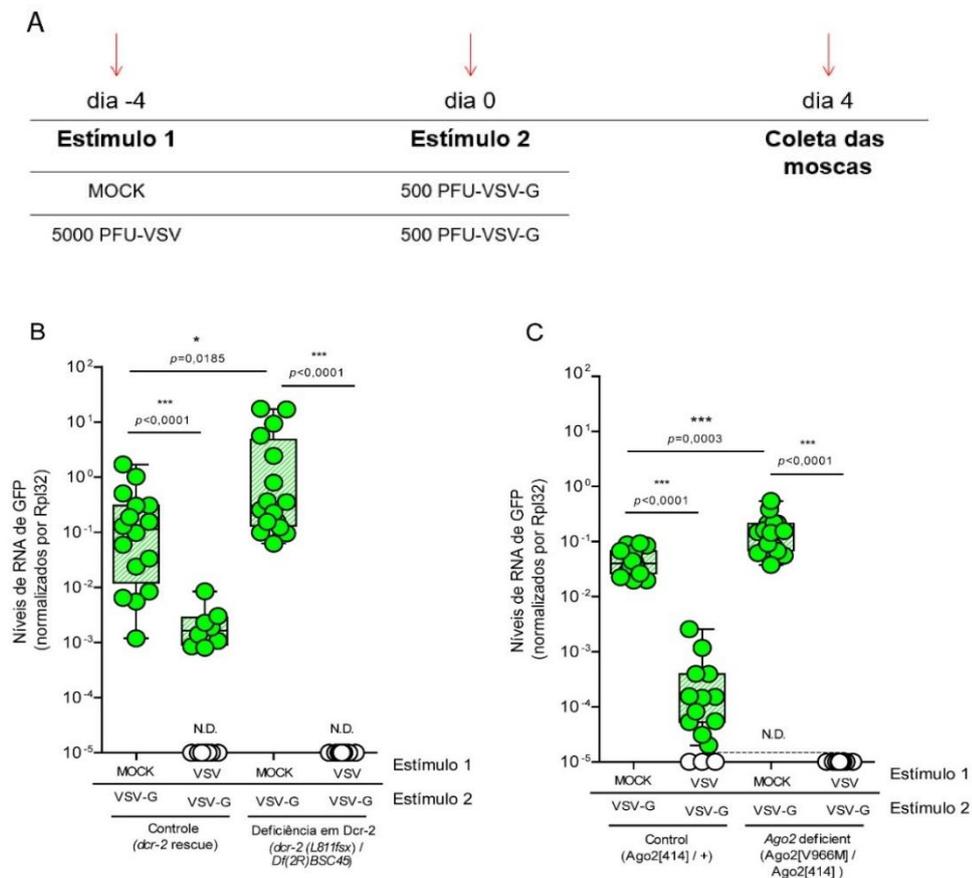


Figura 22: O efeito de interferência pelo VSV sobre o estabelecimento de uma infecção viral homóloga não é dependente da via de RNAi. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas deficientes para *Dcr-2* ($r2d2(1)dcr-2(L811fdx)/Df(2R)BSC45$) e seus controles $r2d2(1)dcr-2(L811fdx)/Df(2R)BSC45-P\{genomic\ rescue\ dicer-2\}$ foram infectadas com 5000 PFU de VSV e quatro dias após foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP (VSV+VSV-G). Um grupo somente injetado com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle da infecção. (MOCK-VSV-G). Moscas deficientes para *Ago2* ($AGO2[414]/AGO2[V966M]$) e seus controles ($ago2[414]/+$) também foram submetidos às mesmas condições de infecção. Após quatro dias da segunda infecção todas as moscas foram coletadas para a extração de RNA. B) e C) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rp132*. Cada símbolo representa uma mosca individual. Os símbolos abertos representam os indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para GFP (ND – não detectado). Os valores do limite de detecção foram atribuídos aos indivíduos que não apresentaram sinal de qPCR para a análise estatística. Valores de *p* significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere a valores de *p* não significativos.

Embora a via de siRNAi não seja um mecanismo de primagem imune, outras respostas imunes poderiam contribuir para o controle da infecção secundária após a infecção primária em moscas. Os hemócitos, são células fagocitárias importantes no controle da infecção pelo VSV (Lamiable, Arnold et al. 2016). Estas células também foram associadas a captação de dsRNA viral para ativar uma resposta sistêmica mediada pela via de siRNA em *Drosophila* (Tassetto, Kunitomi et al. 2017).

Para avaliar a participação dos hemócitos em mediar o efeito de primagem, nós utilizamos moscas depletadas geneticamente para estas células e procedemos com a estratégia de infecção utilizado o VSV e o VSV-GFP. Observamos que a prévia infecção com VSV reduziu significativamente a replicação do VSV-GFP mesmo na ausência dos hemócitos, assim como ocorreu com os grupos controles (Figura 23A). Embora os hemócitos sejam importantes na resposta antiviral contra o VSV, não verificamos o aumento da replicação viral na ausência destas células. Como a carga viral foi quantificada pela expressão de GFP, é necessário quantificarmos a expressão outro gene viral, para analisarmos a participação dos fagócitos na resposta contra o VSV.

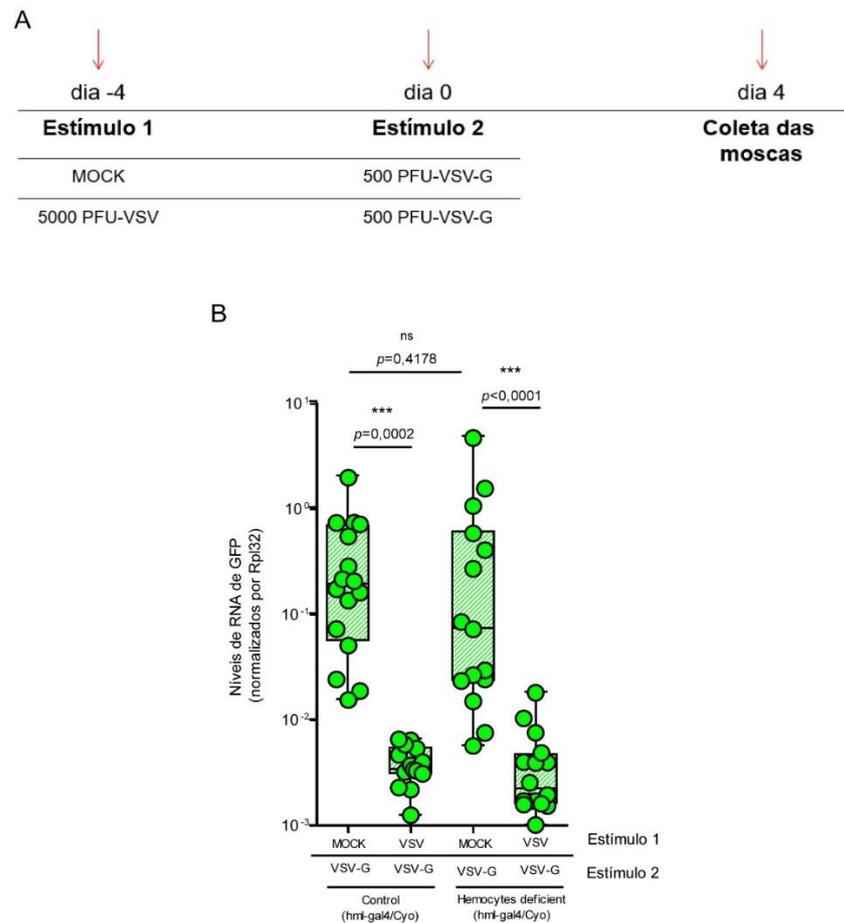


Figura 23: Análise da contribuição dos hemócitos no controle da infecção secundária viral após a infecção primária homóloga. A) Representação esquemática da estratégia experimental. Moscas deficientes para hemócitos ($P\{Hml-GAL4\}/\{UAS-bacx\}$) e seus controles ($P\{Hml-GAL4\}/Cyo$) foram infectadas com 5000 PFU do VSV e quatro dias após, foram infectadas com 500 PFU de VSV-GFP (VSV+VSV-G). Um grupo somente infectado com 500 PFU de VSV-GFP foi criado como controle do experimento (VSV+VSV-G). B) Quantificação da expressão do gene GFP entre os grupos de infecção, normalizada pela expressão do gene constitutivo *Rpl32*. Valores de p significativos estão indicados no gráfico. n.s se refere ao valor de p não significativo.

Portanto, o efeito de interferência observado por nós provavelmente não constitui um mecanismo de primagem imune e sim de competição viral. Mesmo na ausência de componentes da resposta antiviral em moscas, verificamos o efeito de interferência sobre a replicação do vírus da infecção secundária após uma prévia infecção. Embora o tratamento com dsRNA isoladamente interfira com a replicação do VSV, no contexto de uma infecção viral, a competição entre os vírus parece ser mais importante para o efeito de interferência do que a ativação da via de siRNAs ou participação dos hemócitos.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho mostrou a existência de um mecanismo de interferência sobre a infecção viral secundária após a infecção primária pelo vírus homólogo em *Drosophila melanogaster*. Este mecanismo é dependente da replicação viral, uma vez que o VSV e o SINV inativados por luz UV não induzem de forma consistente a diminuição carga viral de uma infecção subsequente. Embora a replicação viral seja importante em induzir o efeito de interferência, os nossos resultados sugerem que o dsRNA de origem viral não seja o principal ativador deste mecanismo. Mesmo na ausência do processamento do dsRNA pela via de siRNAs e conseqüentemente produção de siRNAs virais, houve inibição da replicação do VSV-GFP referente à segunda infecção, após a prévia infecção pelo VSV em moscas deficientes para a via.

O aumento da carga viral em moscas deficientes para AGO2 e Dcr-2, poderia levar ao consumo de grande parte dos recursos celulares necessários para a replicação e montagem da partícula viral após a primeira infecção. Assim, ao infectar a célula, o segundo vírus não encontra recursos suficientes para a sua replicação levando à redução da carga viral. Portanto, mesmo que a via de RNAi seja importante para controlar a infecção pelo VSV, ela não é o mecanismo que inibe a replicação do segundo vírus. Sugerimos então que o efeito de interferência observado por nós seja consequência da competição direta entre os vírus e não um mecanismo primagem imune antiviral.

Devemos considerar também, que na ausência de Dcr-2 e AGO2, poderia haver a ativação de outras vias antivirais para compensar a deficiência da via de siRNAs. Assim, a ativação destes mecanismos poderia mediar o controle da infecção secundária. Em nosso modelo, utilizamos moscas deficientes para hemócitos, já que estas células são necessárias para o controle de algumas infecções virais em *Drosophila* (Lamiable, Arnold et al. 2016). No entanto, o efeito de redução da replicação viral do VSV após o estímulo viral ocorre mesmo na ausência dos fagócitos. Este resultado corrobora a hipótese de que moscas não apresentam um mecanismo de imunidade primada após a infecção viral, embora apresentem um mecanismo da primagem da via de siRNA ativado por um dsRNA isoladamente. Neste caso, os hemócitos poderiam contribuir para o efeito de primagem da via após a endocitose do

dsRNA, como mencionado no trabalho de Tassetto e colaboradores (Tassetto, Kunitomi et al. 2017).

Além do efeito de redução da carga viral após a primeira infecção viral, também observamos o efeito oposto, onde o VSV parece interferir de maneira positiva sobre a infecção subsequente com o SINV em moscas selvagens, bem como o SINV-UV parece favorecer a replicação do mesmo vírus e do DENV1. Alguns trabalhos descrevem este efeito como “acomodação viral”, onde os dois vírus podem co-existir dentro do mesmo hospedeiro, de forma que um vírus afete de maneira positiva a infecção por outro vírus (Sivaram, Barde et al. 2010). Neste caso, o efeito se refere a um mecanismo de interferência viral.

Apesar de não observarmos a existência de primagem imune antiviral em *Drosophila*, nosso modelo possibilitou caracterizar a nível molecular uma parte do mecanismo de silenciamento induzido pelo complexo RISC. Os siRNAs gerados pelo processamento de um dsRNA complementar a sequencias virais associados a AGO2, promovem a clivagem de sequencias de RNAs virais, contribuindo para a inibição da replicação do vírus de uma infecção subsequente. Utilizando dois modelos virais que apresentam estratégias distintas de replicação encontramos uma característica importante da resposta antiviral baseada na via de siRNAs: os seus transcritos parecerem ser preferencialmente os alvos ação dos siRNAs e conseqüentemente clivagem pela AGO2.

Análise de sequenciamento de pequenos RNAs após a infecção com SINV e VSV em *Drosophila*, mostrou que os siRNAs virais se originam tanto do genoma quanto do antigenoma de ambos os vírus ao identificarem a distribuição dos siRNAs em ambas as fitas de RNA (Mueller, Gausson et al. 2010, Marques, Wang et al. 2013). Este mapeamento foi em números equivalentes nas fitas senso e antisenso dos vírus, indicando que o dsRNA é preferencialmente o substrato da biogênese de siRNAs. O intermediário viral de dsRNA pode originar a partir da transcrição de genes virais, quando há a formação do duplex de transcrito-genoma, no caso de vírus de RNA de polaridade negativa e duplex de transcrito-antigenoma, no caso de vírus de RNA de polaridade positiva. Pode ainda originar de intermediários de genoma e antigenoma durante a replicação. Assim, o processamento de dsRNA gera os siRNAs virais que,

associados a AGO2, poderiam silenciar o genoma ou o antigenoma de polaridade oposta, além dos transcritos virais.

Inicialmente, o tratamento prévio com dsVSV complementar a sequência N não permitiu diferenciar qual espécie de RNA seria alvo dos siRNAs. Neste caso, os siRNAs gerados pelo processamento do dsVSV poderiam se ligar no seu RNA mensageiro ou diretamente na sequência referente ao gene N no genoma viral. Uma vez que ocorre o silenciamento de qualquer parte do genoma, ou de um gene essencial para o vírus, haverá a interferência na expressão dos demais genes virais, como o gene L e o gene GFP. O prévio tratamento com um dsRNA complementar ao gene recombinante de GFP que também é expresso no VSV não inibiu a expressão do gene L. Este resultado indica que os siRNAs gerados pelo processamento de dsGFP não se ligam diretamente no seu genoma viral. Eles parecem se ligar no seu RNA mensageiro alvo, promovendo a sua clivagem no complexo RISC, e, portanto, somente inibindo a expressão de GFP. Como GFP não é um gene essencial para a replicação viral, o seu silenciamento não interfere com a expressão do gene L. Além do dsGFP não ser capaz de inibir a infecção viral, poderia ainda competir pelo maquinário da via de siRNAs, favorecendo a replicação do vírus. O tratamento com dsGFP parece sobrecarregar a via de siRNA de modo que a replicação pelo VSV-GFP não seja controlada eficientemente bem por esta via nos tempos precoces da infecção (figuras 19B e 19D).

O genoma do VSV é aproximadamente seis vezes mais abundante que o antigenoma que é usado como *template* para a síntese dos transcritos (Marques, Wang et al. 2013). Este fato provavelmente impossibilitou a detecção do silenciamento do dsGFP sobre o seu próprio transcrito (figura 19C e 19E). No entanto, a normalização da expressão de GFP sobre a expressão do gene L, que não é afetado pelo dsGFP, mostrou uma redução significativa da expressão do gene repórter após dois e quatro dias de infecção indicando que os siRNAs são capazes de mediar o silenciamento dos transcritos virais (figura 19F).

O SINV é um vírus de RNA de polaridade positiva, poliadenilado e o seu genoma age como RNA mensageiro da poliproteína não estrutural na fase inicial da infecção. Portanto, a realização de reações de RT-qPCR com oligo-dT não nos ajudaria a quantificar preferencialmente os transcritos virais, embora nem todos os

RNAs de polaridade positiva do SINV sejam poliadenilados (Sawicki and Gomatos 1976).

O tratamento de moscas com dsRNA complementar à sequência gênica de nsP4 do SINV reduziu significativamente a expressão do gene referente à poliproteína não estrutural quantificado pela expressão de nsP2. nsP4 expressa a polimerase viral, logo o seu silenciamento irá interferir diretamente com a síntese das demais nsPs, como nsP2. Neste caso, os siRNAs gerados pelo processamento de dsSINV poderiam se ligar diretamente no genoma viral, na sequência relativa a nsP4, ou na mesma sequência no antígenoma de polaridade negativa, que é usado como *template* para a síntese no genoma e subgenoma. Em ambas as situações, o tratamento com dsSINV afetaria a expressão dos genes referentes às proteínas não estruturais e as estruturais (figuras 21C e 21D).

O GFP de SINV, assim como as demais proteínas estruturais é expresso em um subgenoma independente para a tradução da proteína. A sua sequência também está inserida no genoma do vírus, já que o complexo replicativo a usa como molde para a síntese do antígenoma e a partir daí a síntese do subgenoma. Portanto, os siRNAs gerados pelo processamento do dsGFP poderiam se ligar no genoma, no antígenoma ou no RNA subgenômico, promovendo somente a inibição da expressão de GFP ou dos demais genes virais, dependendo do RNA alvo dos siRNAs. O tratamento com o dsGFP não interferiu com a expressão do gene de nsP2 após dois e quatro dias de infecção, indicando que os siRNAs não estão se ligando ao RNA genômico. Também detectamos a redução significativa da expressão de GFP em moscas previamente tratadas com o dsGFP comparado aos grupos controles (figuras 21E e 21F). O subgenoma do SINV é mais expresso que o genoma viral. No estágio tardio da infecção, após a completa clivagem das nsPs, o complexo replicativo favorece a produção de subgenoma do que genoma (Lemm, Rumenapf et al. 1994, Shirako and Strauss 1994). Diferentemente do que ocorreu com o modelo de VSV, este fato pode ter permitido a detecção do silenciamento do GFP sobre o seu próprio transcrito após o tratamento com dsGFP em moscas infectadas com SINV. Nossas análises também mostraram que com oito dias de infecção, o dsGFP parece silenciar diretamente o genoma viral do SINV (figura 21C). Como há o aumento da replicação em tempos tardios de infecção, o genoma poderia ficar mais acessível aos siRNAs

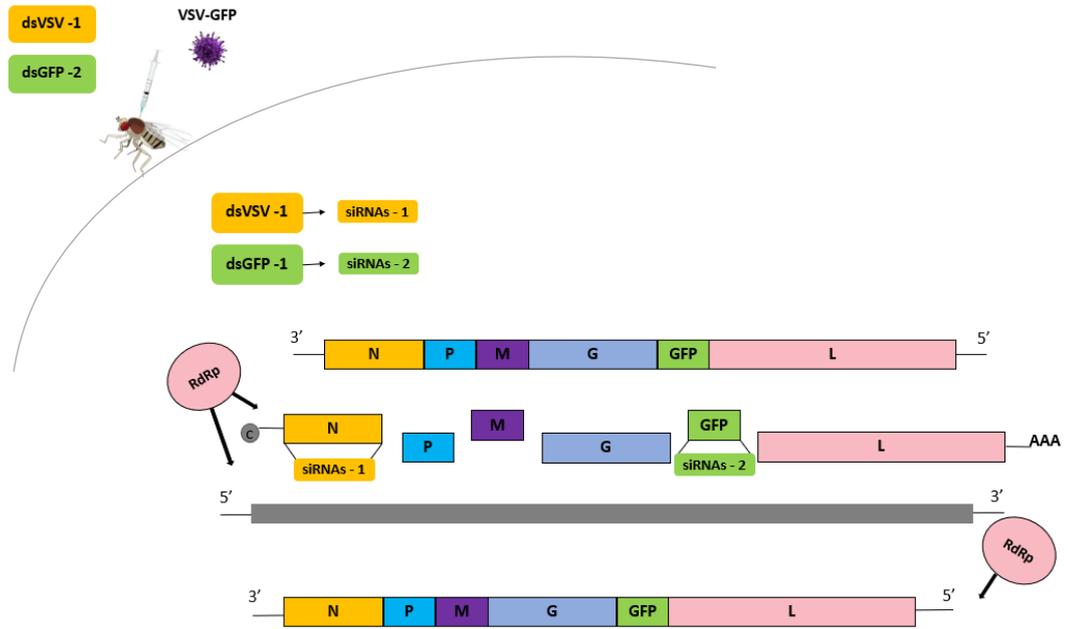
gerados pelo processamento do dsGFP. Nesta situação, os siRNAs passariam a promover o silenciamento direto do genoma viral. Mas novos experimentos são necessários para comprovar este dado.

Utilizando modelos de tratamento *in vivo* com dsRNAs complementares a sequências virais, sugerimos que os transcritos virais sejam os alvos preferenciais da ação dos siRNAs gerados durante a infecção por vírus de RNA em *Drosophila* (Figura 24). Mesmo quando o genoma viral é de polaridade positiva e age como próprio transcrito, como é o caso do SINV, os siRNAs parecem ter preferência em silenciar o transcrito viral expresso em fase tardia da infecção, embora a sua sequência também esteja inserida do genoma viral (figura 24). Vale ressaltar que, os siRNAs originários de sequências gênicas da poliproteína não estrutural do SINV, somente poderiam se ligar ao genoma ou antigenoma de polaridade oposta, já que não há a síntese de um subgenoma para nsPs, diferentemente dos siRNAs originários de GFP.

Ao infectar as células, o genoma do SINV é diretamente traduzido, podendo escapar da ação dos siRNAs, para promover o silenciamento. O complexo RISC, provavelmente próximo aos ribossomos, só passaria a detectar as sequências complementares de RNAs após o complexo replicativo iniciar a síntese do antigenoma e então subgenoma. Como o VSV é de polaridade negativa, ocorre primeiramente a transcrição de cada gene para então, ser traduzido pelos ribossomos celulares. AGO2 associada aos siRNAs e localizada próxima aos ribossomos, silenciaria as sequências de RNAs mensageiros complementares, antes de serem traduzidos.

Entender a biologia básica do principal mecanismo antiviral de insetos, através do estudo da dinâmica do silenciamento viral após a ativação da via de siRNAs, nos permite avaliar melhor como os insetos respondem a infecção viral e de que modo esta resposta poderia ser usada como ferramenta de controle de arboviroses no inseto vetor.

A



B

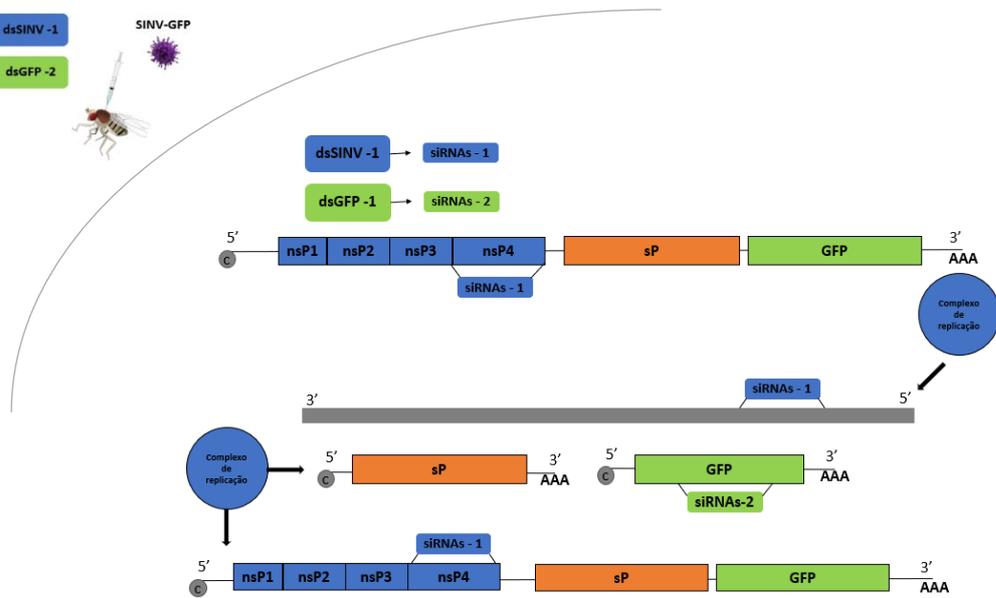


Figura 24: Modelo do mecanismo de inibição do RNA viral mediado pelos siRNAs. (A) O prévio tratamento com dsRNAs complementares às sequências dos genes N e GFP de VSV induz a produção de siRNAs após o processamento. Os siRNAs se ligam preferencialmente aos transcritos referentes às proteínas N e GFP promovendo a sua clivagem mediada por AGO2. Enquanto o silenciamento do gene N afeta a replicação do vírus, o silenciamento de GFP não interfere neste processo. (B) O prévio tratamento com dsRNAs complementares às sequências dos genes nsP4 e GFP de SINV induz a produção de siRNAs após o processamento de cada dsRNA. Os siRNAs referentes ao gene nsP4 podem reconhecer sequências complementares no genoma ou no antígenoma de polaridade oposta para promover o silenciamento. Embora a sequência de GFP esteja inserida no genoma e no antígenoma viral, os siRNAs gerados pelo processamento de dsGFP se ligam preferencialmente no subgenoma referente ao GFP, que age como RNA mensageiro para a sua tradução. O silenciamento do gene nsP4 afeta a replicação do vírus enquanto o silenciamento de GFP não interfere neste processo.

7. CONCLUSÕES

- Caracterizamos um modelo de infecção com dois vírus em *Drosophila*;
- Identificamos um efeito de interferência sobre a replicação de um vírus durante uma infecção secundária após as moscas terem sido expostas ao mesmo agente em uma infecção primária;
- O efeito de interferência é dependente da replicação do vírus da infecção primária;
- O dsRNA completar a sequências de genes essenciais para os vírus é capaz de primar a via de siRNA e inibir a replicação do vírus homólogo de uma infecção subsequente;
- O mecanismo de inibição da replicação viral após a primagem da via de siRNA ocorre preferencialmente pelo silenciamento dos transcritos virais e não pelo silenciamento do genoma.
- A primagem imune contra vírus não é mediada pela via de siRNA após uma prévia infecção viral em moscas.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar a participação dos hemócitos em mediar a primagem da via de siRNA após o estímulo por um dsRNA complementar a sequências virais.
- Utilizar de outros modelos, como linhagens de células de diferentes origens, para avaliar o mecanismo de inibição do RNA viral pela via de siRNA.
- Utilizar de outras estratégias experimentais para avaliar o silenciamento de transcritos virais pela via de siRNAi, como a utilização de *beads* magnéticas que imunoprecipitam RNAs poliadenilados.
- Avaliar se a inibição da transcrição de genes virais inibe a produção das proteínas referentes aos genes.
- Avaliar a localização celular do complexo RISC após o tratamento com dsRNA complementar às sequências virais.
- Avaliar a participação de outras moléculas de origem viral que possam primar a via de siRNA, como moléculas de vDNAs.
- Realizar o sequenciamento de pequenos RNAs de células ou moscas após a primagem com dsRNA e subsequente infecção viral.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin and J. C. Venter (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.
- Adouchief, S., T. Smura, J. Sane, O. Vapalahti and S. Kurkela (2016). "Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis." Rev Med Virol **26**(4): 221-241.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Berrigan, D. and L. Partridge (1997). "Influence of temperature and activity on the metabolic rate of adult *Drosophila melanogaster*." Comp Biochem Physiol A Physiol **118**(4): 1301-1307.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.
- Caudy, A. A., M. Myers, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2002). "Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery." Genes Dev **16**(19): 2491-2496.
- Clem, R. J. (2015). "Viral IAPs, then and now." Semin Cell Dev Biol **39**: 72-79.

- Cogni, R., C. Cao, J. P. Day, C. Bridson and F. M. Jiggins (2016). "The genetic architecture of resistance to virus infection in *Drosophila*." *Mol Ecol* **25**(20): 5228-5241.
- Contamine, D., A. M. Petitjean and M. Ashburner (1989). "Genetic resistance to viral infection: the molecular cloning of a *Drosophila* gene that restricts infection by the rhabdovirus sigma." *Genetics* **123**(3): 525-533.
- Costa, A., E. Jan, P. Sarnow and D. Schneider (2009). "The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*." *PLoS One* **4**(10): e7436.
- Czech, B., C. D. Malone, R. Zhou, A. Stark, C. Schlingeheyde, M. Dus, N. Perrimon, M. Kellis, J. A. Wohlschlegel, R. Sachidanandam, G. J. Hannon and J. Brennecke (2008). "An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*." *Nature* **453**(7196): 798-802.
- de Faria, I. J., R. P. Olmo, E. G. Silva and J. T. Marques (2013). "dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals." *J Interferon Cytokine Res* **33**(5): 239-253.
- Deddouche, S., N. Matt, A. Budd, S. Mueller, C. Kemp, D. Galiana-Arnoux, C. Dostert, C. Antoniewski, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2008). "The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *drosophila*." *Nat Immunol* **9**(12): 1425-1432.
- Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2005). "The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *drosophila*." *Nat Immunol* **6**(9): 946-953.
- Dupuis, S., E. Jouanguy, S. Al-Hajjar, C. Fieschi, I. Z. Al-Mohsen, S. Al-Jumaah, K. Yang, A. Chapgier, C. Eidenschenk, P. Eid, A. Al Ghonaïum, H. Tufenkeji, H. Frayha, S. Al-Gazlan, H. Al-Rayes, R. D. Schreiber, I. Gresser and J. L. Casanova (2003). "Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency." *Nat Genet* **33**(3): 388-391.
- Ferreira, A. G., H. Naylor, S. S. Esteves, I. S. Pais, N. E. Martins and L. Teixeira (2014). "The Toll-dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila*." *PLoS Pathog* **10**(12): e1004507.
- Frolova, E. I., R. Gorchakov, L. Pereboeva, S. Atasheva and I. Frolov (2010). "Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane." *J Virol* **84**(22): 11679-11695.
- Goic, B., K. A. Stapleford, L. Frangeul, A. J. Doucet, V. Gausson, H. Blanc, N. Schemmel-Jofre, G. Cristofari, L. Lambrechts, M. Vignuzzi and M. C. Saleh (2016). "Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection." *Nat Commun* **7**: 12410.
- Goic, B., N. Vodovar, J. A. Mondotte, C. Monot, L. Frangeul, H. Blanc, V. Gausson, J. Vera-Otarola, G. Cristofari and M. C. Saleh (2013). "RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*." *Nat Immunol* **14**(4): 396-403.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." *Science* **284**(5418): 1313-1318.
- Hussain, M. and S. Asgari (2014). "MicroRNAs as mediators of insect host-pathogen interactions and immunity." *J Insect Physiol* **70**: 151-158.

- Ishizuka, A., M. C. Siomi and H. Siomi (2002). "A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins." *Genes Dev* **16**(19): 2497-2508.
- Kanthong, N., N. Khemnu, S. N. Pattanakitsakul, P. Malasit and T. W. Flegel (2010). "Persistent, triple-virus co-infections in mosquito cells." *BMC Microbiol* **10**: 14.
- Karlikow, M., B. Goic, V. Mongelli, A. Salles, C. Schmitt, I. Bonne, C. Zurzolo and M. C. Saleh (2016). "Drosophila cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells." *Sci Rep* **6**: 27085.
- Kemp, C., S. Mueller, A. Goto, V. Barbier, S. Paro, F. Bonnay, C. Dostert, L. Troxler, C. Hetru, C. Meignin, S. Pfeffer, J. A. Hoffmann and J. L. Imler (2013). "Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in *Drosophila*." *J Immunol* **190**(2): 650-658.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." *Cell* **95**(7): 1017-1026.
- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (2000). "Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA." *Nat Biotechnol* **18**(8): 896-898.
- Lamiable, O., J. Arnold, I. J. da Silva de Faria, R. Proveti Olmo, F. Bergami, C. Meignin, J. A. Hoffmann, J. T. Marques and J. L. Imler (2016). "Analysis of the contribution of hemocytes and autophagy to *Drosophila* antiviral immunity." *J Virol*.
- Lamiable, O., J. Arnold, I. de Faria, R. P. Olmo, F. Bergami, C. Meignin, J. A. Hoffmann, J. T. Marques and J. L. Imler (2016). "Analysis of the Contribution of Hemocytes and Autophagy to *Drosophila* Antiviral Immunity." *J Virol* **90**(11): 5415-5426.
- Lamiable, O., C. Kellenberger, C. Kemp, L. Troxler, N. Pelte, M. Boutros, J. T. Marques, L. Daeffler, J. A. Hoffmann, A. Roussel and J. L. Imler (2016). "Cytokine Dieldel and a viral homologue suppress the IMD pathway in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(3): 698-703.
- Lemaitre, B. and J. Hoffmann (2007). "The host defense of *Drosophila melanogaster*." *Annu Rev Immunol* **25**: 697-743.
- Lemm, J. A., T. Rumenapf, E. G. Strauss, J. H. Strauss and C. M. Rice (1994). "Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis." *EMBO J* **13**(12): 2925-2934.
- Leung, J. Y., M. M. Ng and J. J. Chu (2011). "Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells." *Adv Virol* **2011**: 249640.
- Lichty, B. D., A. T. Power, D. F. Stojdl and J. C. Bell (2004). "Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet." *Trends Mol Med* **10**(5): 210-216.
- Lytle, C. D. and J. L. Sagripanti (2005). "Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation." *J Virol* **79**(22): 14244-14252.
- Majzoub, K., M. L. Hafirassou, C. Meignin, A. Goto, S. Marzi, A. Fedorova, Y. Verdier, J. Vinh, J. A. Hoffmann, F. Martin, T. F. Baumert, C. Schuster and J. L. Imler (2014). "RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses." *Cell* **159**(5): 1086-1095.

- Malone, C. D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W. R. McCombie, R. Sachidanandam and G. J. Hannon (2009). "Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary." Cell **137**(3): 522-535.
- Marques, J. T. and J. L. Imler (2016). "The diversity of insect antiviral immunity: insights from viruses." Curr Opin Microbiol **32**: 71-76.
- Marques, J. T., K. Kim, P. H. Wu, T. M. Alleyne, N. Jafari and R. W. Carthew (2010). "Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*." Nat Struct Mol Biol **17**(1): 24-30.
- Marques, J. T., J. P. Wang, X. Wang, K. P. de Oliveira, C. Gao, E. R. Aguiar, N. Jafari and R. W. Carthew (2013). "Functional specialization of the small interfering RNA pathway in response to virus infection." PLoS Pathog **9**(8): e1003579.
- Martins, N., J. L. Imler and C. Meignin (2016). "Discovery of novel targets for antivirals: learning from flies." Curr Opin Virol **20**: 64-70.
- Misof, B., S. Liu, K. Meusemann, R. S. Peters, A. Donath, C. Mayer, P. B. Frandsen, J. Ware, T. Flouri, R. G. Beutel, O. Niehuis, M. Petersen, F. Izquierdo-Carrasco, T. Wappler, J. Rust, A. J. Aberer, U. Aspöck, H. Aspöck, D. Bartel, A. Blanke, S. Berger, A. Böhm, T. R. Buckley, B. Calcott, J. Chen, F. Friedrich, M. Fukui, M. Fujita, C. Greve, P. Grobe, S. Gu, Y. Huang, L. S. Jermin, A. Y. Kawahara, L. Krogmann, M. Kubiak, R. Lanfear, H. Letsch, Y. Li, Z. Li, J. Li, H. Lu, R. Machida, Y. Mashimo, P. Kapli, D. D. McKenna, G. Meng, Y. Nakagaki, J. L. Navarrete-Heredia, M. Ott, Y. Ou, G. Pass, L. Podsiadlowski, H. Pohl, B. M. von Reumont, K. Schütte, K. Sekiya, S. Shimizu, A. Slipinski, A. Stamatakis, W. Song, X. Su, N. U. Szucsich, M. Tan, X. Tan, M. Tang, J. Tang, G. Timelthaler, S. Tomizuka, M. Trautwein, X. Tong, T. Uchifune, M. G. Walz, B. M. Wiegmann, J. Wilbrandt, B. Wipfler, T. K. Wong, Q. Wu, G. Wu, Y. Xie, S. Yang, Q. Yang, D. K. Yeates, K. Yoshizawa, Q. Zhang, R. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao, C. Zhou, L. Zhou, T. Ziesmann, S. Zou, Y. Li, X. Xu, Y. Zhang, H. Yang, J. Wang, J. Wang, K. M. Kjer and X. Zhou (2014). "Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution." Science **346**(6210): 763-767.
- Mondotte, J. A. and M. C. Saleh (2018). "Antiviral Immune Response and the Route of Infection in *Drosophila melanogaster*." Adv Virus Res **100**: 247-278.
- Morin, B., A. A. Rahmeh and S. P. Whelan (2012). "Mechanism of RNA synthesis initiation by the vesicular stomatitis virus polymerase." EMBO J **31**(5): 1320-1329.
- Mueller, S., V. Gausson, N. Vodovar, S. Deddouche, L. Troxler, J. Perot, S. Pfeffer, J. A. Hoffmann, M. C. Saleh and J. L. Imler (2010). "RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(45): 19390-19395.
- Mussabekova, A., L. Daeffler and J. L. Imler (2017). "Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*." Cell Mol Life Sci **74**(11): 2039-2054.
- Nainu, F., Y. Tanaka, A. Shiratsuchi and Y. Nakanishi (2015). "Protection of Insects against Viral Infection by Apoptosis-Dependent Phagocytosis." J Immunol **195**(12): 5696-5706.
- Netea, M. G., J. Quintin and J. W. van der Meer (2011). "Trained immunity: a memory for innate host defense." Cell Host Microbe **9**(5): 355-361.

- Okamura, K., W. J. Chung, J. G. Ruby, H. Guo, D. P. Bartel and E. C. Lai (2008). "The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs." Nature **453**(7196): 803-806.
- Padmanabha, D. and K. D. Baker (2014). "Drosophila gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism." Trends Endocrinol Metab **25**(10): 518-527.
- Petit, M., V. Mongelli, L. Frangeul, H. Blanc, F. Jiggins and M. C. Saleh (2016). "piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(29): E4218-4227.
- Pham, L. N., M. S. Dionne, M. Shirasu-Hiza and D. S. Schneider (2007). "A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes." PLoS Pathog **3**(3): e26.
- Pietila, M. K., K. Hellstrom and T. Ahola (2017). "Alphavirus polymerase and RNA replication." Virus Res **234**: 44-57.
- Poirier, E. Z., B. Goic, L. Tome-Poderti, L. Frangeul, J. Boussier, V. Gausson, H. Blanc, T. Vallet, H. Loyd, L. I. Levi, S. Lanciano, C. Baron, S. H. Merklung, L. Lambrechts, M. Mirouze, S. Carpenter, M. Vignuzzi and M. C. Saleh (2018). "Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects." Cell Host Microbe **23**(3): 353-365 e358.
- Quintin, J., S. C. Cheng, J. W. van der Meer and M. G. Netea (2014). "Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms." Curr Opin Immunol **29**: 1-7.
- Ramirez, J. L., G. de Almeida Oliveira, E. Calvo, J. Dalli, R. A. Colas, C. N. Serhan, J. M. Ribeiro and C. Barillas-Mury (2015). "A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in *Anopheles gambiae*." Nat Commun **6**: 7403.
- Rodrigues, J., F. A. Brayner, L. C. Alves, R. Dixit and C. Barillas-Mury (2010). "Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes." Science **329**(5997): 1353-1355.
- Rupp, J. C., K. J. Sokoloski, N. N. Gebhart and R. W. Hardy (2015). "Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions." J Gen Virol **96**(9): 2483-2500.
- Sabin, L. R., S. L. Hanna and S. Cherry (2010). "Innate antiviral immunity in *Drosophila*." Curr Opin Immunol **22**(1): 4-9.
- Saleh, M. C., M. Tassetto, R. P. van Rij, B. Goic, V. Gausson, B. Berry, C. Jacquier, C. Antoniewski and R. Andino (2009). "Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread." Nature **458**(7236): 346-350.
- Sawicki, D. L. and P. J. Gomas (1976). "Replication of semliki forest virus: polyadenylate in plus-strand RNA and polyuridylylate in minus-strand RNA." J Virol **20**(2): 446-464.
- Shirako, Y. and J. H. Strauss (1994). "Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis." J Virol **68**(3): 1874-1885.
- Sivaram, A., P. V. Barde, M. D. Gokhale, D. K. Singh and D. T. Mourya (2010). "Evidence of co-infection of chikungunya and dengue viruses in C6/36 cell lines and laboratory infected *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes." Parasit Vectors **3**: 95.

Soares, Z. G., A. N. Goncalves, K. P. de Oliveira and J. T. Marques (2014). "Viral RNA recognition by the *Drosophila* small interfering RNA pathway." *Microbes Infect* **16**(12): 1013-1021.

St Johnston, D. and C. Nusslein-Volhard (1992). "The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo." *Cell* **68**(2): 201-219.

Tassetto, M., M. Kunitomi and R. Andino (2017). "Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*." *Cell* **169**(2): 314-325 e313.

Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel and P. A. Sharp (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." *Genes Dev* **13**(24): 3191-3197.

Wang, X. H., R. Aliyari, W. X. Li, H. W. Li, K. Kim, R. Carthew, P. Atkinson and S. W. Ding (2006). "RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*." *Science* **312**(5772): 452-454.