



UNIGRANRIO
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

PATRÍCIA FURTADO FREIXO

O *flebovírus* amazônico (*Bunyaviridae*) potencializa a infecção de *Leishmania amazonensis* : Papel do eixo PKR / IFN1 / IL-10

Duque de Caxias
2021

PATRÍCIA FURTADO FREIXO

O *flebovírus* amazônico (*Bunyaviridae*) potencializa a infecção de *Leishmania amazonensis* : Papel do eixo PKR / IFN1 / IL-10

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio Professor José de Souza
Herdy, como objeto obrigatório de avaliação final
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.
Orientador(a): Prfª Lauracy Monzato

DUQUE DE CAXIAS
2021

PATRÍCIA FURTADO FREIXO

O flebovírus amazônico (*Bunyaviridae*) potencializa a infecção de *Leishmania amazonensis* : Papel do eixo PKR / IFN1 / IL-10

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade do Grande Rio Professor José de Souza Herdy, como objeto obrigatório de avaliação final para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.
Aprovado em, __/__/2021.

FS237f Furtado Freixo, Patrícia
O flebovírus amazônico (*Bunyaviridae*)
potencializa a infecção de *Leishmania amazonensis* :
Papel do eixo PKR / IFN1 / IL-10 / Patrícia Furtado
Freixo. -- Rio de Janeiro, 2021.
37 f.

Orientadora: Lauracy Monzato.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Macaé Professor Aloisio Teixeira, Bacharel em
Farmácia, 2021.

1. Leishmaniose . 2. PKR. 3. IL-10. 4.
flebovírus . 5. IFN1. I. Monzato, Lauracy , orient.
II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador Lauracy Monzato

Prof. Ms. Lásaro Linhares Stephanelli

Sumário

RESUMO/ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA.....	7
3. OBJETIVOS.....	8
3.1 Objetivos gerais	8
3.2 Objetivos específicos	8
4.METODOLOGIA.....	9
5. Leishmaniose	9
5.1 Gênero leishmania	10
5.1.2 Ciclo de vida e infecção	11
5.2 O gênero <i>Phlebovirus</i> : classificação, patologia e transmissão	16
5.2.1 Interações vetor – <i>Phlebovirus</i>	18
5.3 Resposta imune durante a Leishmaniose	21
5.4 Receptores do Tipo Toll (TLR)	23
5.4.1 Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll	23
5.4.2 Interação das <i>Leishmanias</i> com os receptores do tipo Toll	24
5.5 PKR	26
5.5.1 Estrutura, função e ativação de PKR	26
6 Resultados	28
6.1 Crescimento intracelular de <i>Leishmania Amazonensis</i> é exacerbado em resposta a co- infecção com <i>Phlebovírus</i>	26
6.2 A infecção por <i>Phlebovirus</i> (Icoaraci) ativa a sinalização PKR e aumenta a infecção por <i>L.amazonensis</i>	28
6.3 A infecção pelo vírus Icoaraci ativa a via de sinalização do IFN tipo I, favorecendo a infecção por <i>L. Amazonensis</i>	31
6.4 A carga do parasita, a progressão da lesão e a expressão de IFN β estão aumentadas em ensaios de coinfeção in vivo.....	32
6.5 A coinfeção com o vírus da dengue 2 (DENV2) não aumenta a carga de <i>L.</i> <i>Amazonensis</i>	34
7 Conclusão	37
8 Referências	38

RESUMO

A leishmaniose cutânea é altamente prevalente em todo o mundo, afetando milhões de pessoas em países subdesenvolvidos. Parasitas *Leishmania* são transmitidos aos humanos por moscas flebotomíneas. A transmissão ocorre principalmente em áreas rurais, embora a urbanização da doença esteja em andamento. Os vetores de flebotomíneo também podem transmitir vírus de RNA (arbovírus) para humanos. Nosso grupo já demonstrou a indução das vias antivirais do hospedeiro por *L. amazonensis*, uma vez que algumas vias de resposta antiviral potencializam a infecção por *L. amazonensis* e o mesmo grupo de artrópodes vetores de *Leishmania* transmite vírus de RNA pertencente ao gênero Phlebovirus, hipotetizamos que a coinfeção poderia agravar o parasitismo por *L. amazonensis*. Usando um flebovírus isolado de reservatórios de roedores de *L. amazonensis* (Icoaraci), demonstramos que a coinfeção com Icoaraci aumentou a carga parasitária in vivo e in vitro. Essas observações foram parcialmente corroboradas com Pacui, outro isolado de Phlebovirus. O aumento da infecção de macrófagos exigiu a expressão de IFN tipo I induzida pelo parasita e amplificada durante a coinfeção. É importante ressaltar que a infecção por outro arbovírus prevalente, o DENV2, não resultou na exacerbação da infecção do parasita. No geral, os resultados apoiam a importância da análise complexa e multifatorial de processos infecciosos, especialmente em regiões tropicais que freqüentemente têm áreas endêmicas de sobreposição.

ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis is highly prevalent worldwide, affecting millions of people in undeveloped countries. *Leishmania* parasites are transmitted to humans by phlebotomine flies. The transmission occurs mainly in rural areas, although the urbanization of the disease is in process. Phlebotomine vectors may also transmit RNA virus (arboviruses) to humans. Our group has previously demonstrated the induction of the host anti-viral pathways by *L. amazonensis*. Since some anti-viral response pathways potentiate *L. amazonensis* infection and the same group of *Leishmania* arthropod vectors transmits RNA viruses belonging to the genus Phlebovirus, we hypothesized that coinfection could aggravate the parasitism by *L. amazonensis*. Using a phlebovirus isolated from *L. amazonensis* rodents reservoirs (Icoaraci) we demonstrated that Icoaraci coinfection enhanced the parasite load, both in vivo and in vitro. These observations were partially corroborated with Pacui, another Phlebovirus isolate. Increased macrophage infection required IFN type I expression induced by the parasite and amplified during coinfection. Importantly, the infection by another prevalent arbovirus,

DENV2, did not result in the exacerbation of the parasite infection. Overall our results support the importance of complex and multifactorial analysis of infectious processes, especially in tropical regions that frequently have endemic areas of overlap.

1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por tripanossomatídeos (*Leishmania* e *Trypanosoma*), bem como outras doenças tropicais negligenciadas, apresentam-se como um importante problema de Saúde Pública em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Isso levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-las entre as seis doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle. No Brasil, as leishmanioses ocorrem em quase todos os estados, havendo aumento progressivo do número de casos, um possível resultado da urbanização acelerada e alterações ambientais. Seus índices de prevalência são muito elevados na Amazônia brasileira e os programas de controle ainda não conseguiram reduzir o impacto sobre a saúde das populações que vivem nesta área.

Vários membros da nossa equipe vêm participando ativamente de pesquisas que visam à compreensão do papel de vias de sinalização celular, primariamente descritas como vias de resposta antivirais durante o processo de infecção da *L. amazonensis*. Em 2010, pioneiramente, descrevemos um novo papel para a proteína quinase dependente de dsRNA (PKR). Em nosso modelo, a *L. amazonensis* foi capaz de induzir a expressão e ativar PKR em macrófagos infectados. Esse mecanismo se mostrou importante para a produção de IL-10 por esses macrófagos. Essa citocina anti-inflamatória é necessária para o crescimento intracelular da *Leishmania* por reprimir a produção de óxido nítrico (NO).

No ano seguinte, nosso grupo demonstrou que a ativação de PKR durante a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* induz a expressão de interferon (IFN)- β , citocina capaz de regular a superóxido dismutase 1 (SOD1), neutralizando os efeitos das espécies reativas de de oxigênio (ROS). Esse fenômeno foi mediado pelo receptor do tipo Toll 2 (TLR2), sugerindo que as respostas mediadas por receptores do tipo Toll podem ser favoráveis ao crescimento intracelular da *L. amazonensis*, através do eixo PKR-IFN β -SOD1. Por meio de imunohistoquímica, mostramos que pacientes com leishmaniose cutânea difusa (caracterizada por uma elevada resistência a qualquer tipo de quimioterapia) exibem um aumento na expressão de PKR e IFN- β . A razão pelo qual isso ocorre ainda permanece obscura, mas nós podemos supor que quadros de coinfeções *Leishmania*/RNA vírus possam estar ocorrendo após a picada

do inseto vetor da leishmaniose, já que os mesmos também podem abrigar e transmitir vírus de RNA.

Durante a minha iniciação científica, pude estudar o trabalho da Carolina Touturella Rath sobre o papel de TLR3 - outro sensor de dsRNA - na modulação da infecção por *L. amazonensis* em um modelo livre de vírus. Ela e o grupo observaram que TLR3 era importante para a infecção e proliferação intracelular da *L. amazonensis* nos macrófagos peritoneais. Análises *in vivo* também demonstraram que animais TLR3^{-/-} eram mais resistentes a infecção. Ensaio de imunofluorescência indicaram que TLR3 e sua molécula adaptadora (TRIF), eram recrutados para a membrana do vacúolo parasitóforo (VP) da *L. amazonensis*. Análises de *Western Blot* mostraram a presença de uma banda, com aproximadamente 70 kDa, cuja intensidade era diretamente proporcional ao tempo de infecção, indicando um possível processamento de TLR3 pela *L. amazonensis*. Observaram ainda que a expressão de citocinas requeridas para o sucesso da infecção pela *L. amazonensis* (IFN- β e IL-10), foi significativamente reduzidas nos macrófagos TLR3^{-/-}. Os resultados do nosso grupo demonstraram pela primeira vez o papel de TLR3 na resposta imune da leishmaniose em um modelo sem vírus, abrindo perspectivas para a investigação deste receptor como um importante fator no curso de infecções por protozoários. Os mecanismos através dos quais a infecção por *Leishmania* determina a indução das vias de sinalização dependentes de TLR3 ainda permanecem desconhecidos.

A ativação de sensores de RNA, em conjunto com o engajamento de vias de sinalização antivirais se mostraram importantes para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Portanto, o entendimento da participação desses sensores pode contribuir para a compreensão desses elementos como um conector da imunidade antiviral e modulação da coinfeção *Leishmania*/vírus. Além disso, o conhecimento de uma nova via de sinalização envolvida com a resposta imune desencadeada contra um determinado patógeno traz alternativas de tratamento e enriquece nosso conhecimento biológico sobre a interação entre esses organismos patogênicos e o hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA

O Flebovírus mais bem estudado é o Rift Valley Fever Virus (RVFV), responsável por causar uma doença viral aguda, que causa febre, mais comumente observada em animais ruminantes, com capacidade de infectar e causar doenças em humanos. Em geral, humanos infectados com Phlebovirus podem desenvolver uma ampla gama de sinais clínicos e novos

isolados de Phlebovirus emergentes foram descritos em humanos associados a doenças agudas graves.

No presente trabalho testamos a hipótese de que isolados de Phlebovirus da região amazônica aumentam a infecção por *L. amazonensis* via engajamento do sensor de RNA PKR e expressão do IFN tipo I. Nossos dados fornecem fortes evidências de que Phlebovirus aumenta a infecção por *L. amazonensis* e pode moldar o resultado da patologia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar vias de sinalização antivirais induzidas pela infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis* e a potencialização dessas vias no contexto de coinfeção *Leishmania*-vírus, compreender os mecanismos de modulação da sinalização dependente de TLR3 durante a infecção de macrófagos pela *Leishmania amazonensis* e avaliar o efeito das vias de sinalização induzidas por *Phlebovirus* no curso da infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*.

3.2. Objetivos específicos:

- Discriminar as etapas do processo de infecção impactadas por TLR3 interiorização, sobrevivência e/ou proliferação da *L. amazonensis*;
- Avaliar a modulação dos níveis de TLR3 durante a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*;
- Investigar se *L. amazonensis* abriga dsRNA, a exemplo de outras espécies de *Leishmania*;
- Investigar o mecanismo de clivagem de TLR3 durante a infecção por *L. amazonensis*;
- Verificar se a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* dispara a via de sinalização clássica de TLR3 (IRF3).
- Verificar se os *Phlebovirus* são capazes de se replicar nos macrófagos e modular a infecção dessas células por *L. amazonensis*;
- Investigar a indução de vias antivirais dependentes de TLR3 e PKR em macrófagos infectados por *Phlebovirus* e o efeito da indução dessas vias no curso da infecção pela *L. amazonensis*;
- Investigar a expressão de moléculas efetoras dependentes das vias de TLR3 e PKR (IFN- β e IL-10) durante a coinfeção *L. amazonensis*/*Phlebovirus*;

- Comparar o modelo de infecção por *Phlebovirus* com a infecção por outros arbovírus no tocante à produção de mediadores antivirais e à modulação do curso da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*;
- Avaliar o curso da infecção por *L. amazonensis* durante a coinfeção por *Phlebovirus* em modelo murinho.

4. METODOLOGIA

O seguinte trabalho quis testar dois isolados de *Phlebovirus*, Icoaraci e Pacui, dos roedores *Nectomys* sp. e *Oryzomys* sp., respectivamente, ambos reservatórios silvestres naturais de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* da região amazônica. A coinfeção de *Phlebovirus* com *L. (L.) amazonensis* em macrófagos murinos levou ao aumento do crescimento intracelular de *L. (L.) amazonensis*. Novos estudos com a coinfeção com Icoaraci revelaram a necessidade do eixo PKR / IFN1 na exacerbação da infecção do parasita. A coinfeção de *L. (L.) amazonensis* e *Phlebovirus* potencializou a ativação de PKR e induziu sinergicamente a expressão de IFN β e IL-10. É importante ressaltar que a coinfeção in vivo de camundongos C57BL / 6 corroborou os dados in vitro. O efeito de exacerbação do vírus RNA na infecção do parasita pode ser específico porque a coinfeção com o vírus da dengue (DENV2) exerceu o efeito oposto na carga do parasita.

5. LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença tropical e subtropical causada por parasitos do gênero *Leishmania* que são transmitidos por dípteros da subfamília *Phlebotominae* (dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*), no momento do repasto sanguíneo. Através da picada, formas metacíclicas da *Leishmania* são inoculadas e rapidamente engolfadas por células fagocíticas residentes ou por fagócitos recrutados para o sítio da infecção (KAYE; SCOTT, 2011).

De acordo com a OMS, mais de 98 países e territórios são endêmicos para a leishmaniose, sendo uma das seis mais importantes endemias do mundo, e sua relevância vem aumentando devido ao surgimento de casos de coinfeção *Leishmania*/HIV (DESJEUX, 1998; CRUZ et al., 2006; UNAIDS, 2012). Estimativas indicam que 200-400 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) e 0,7-1,3 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) são diagnosticados anualmente em todo o mundo, associadas a aproximadamente 70.000 mortes por ano (KEDZIERSKI, 2010), a maioria atribuída à forma visceralizante da doença. A grande maioria dos casos ocorre na Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia,

Costa Rica, Etiópia, Índia, Irã, Nepal, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; KARIMKHANI et al., 2016). Possivelmente, esses números podem ser subestimados devido a erros de diagnóstico. O diagnóstico da leishmaniose representa um desafio para a medicina, pois seus sintomas são semelhantes a outras doenças infecciosas e/ou malignas, tanto no tecido cutâneo como nos órgãos internos (KARIMKHANI et al., 2016).

5.1 Gênero leishmania

Leishmania spp. são protozoários intracelulares, pertencentes a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Esta ordem é caracterizada por apresentar flagelo e cinetoplasto, uma estrutura altamente organizada com alta concentração de DNA mitocondrial condensado.

As espécies de *Leishmania* foram evolutivamente selecionadas ao estilo de vida intracelular, tornando-se, parasitos obrigatórios no hospedeiro vertebrado (SACKS; SHER, 2002).

Mais de 30 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* podem causar leishmaniose em mamíferos, sendo 20 espécies patogênicas para os seres humanos (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015, AKHOUNDI et al., 2016,). As características clínicas da leishmaniose incluem uma ampla gama de manifestações com diferentes graus de gravidade que dependem tanto das espécies de *Leishmania* envolvida, quanto da resposta imune do hospedeiro (ANDRADE-NARVÁEZ et al., 2001), podendo levar cepas da mesma espécie de parasito a apresentarem diferentes resultados clínicos. Por exemplo, *L. tropica* e *L. amazonensis* tipicamente causam LC, mas também são capazes de causar doenças viscerais em alguns casos.

Enquanto isso, a infecção por *L. infantum*, que pode levar à LV fatal, também pode causar LC sem qualquer disseminação do parasito para o baço ou fígado. A *L. guyanensis* também pode migrar para longe do local da infecção, gerando lesões distais secundárias semelhantes aos observados com *L. braziliensis* (BOSQUE et al., 2000, FOLLADOR et al., 2002).

Essas manifestações variam entre lesões ulcerativas na pele (leishmaniose cutânea), inflamações destrutivas das mucosas (leishmaniose mucocutânea) e infecção visceral, onde os parasitos proliferam em macrófagos do fígado, baço, medula óssea, pulmões, mucosa intestinal e sistema nervoso (leishmaniose visceral ou Kalazar – forma mais agressiva da doença) (WHO, 2016). As leishmanias do Novo Mundo que infectam humanos são agrupadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No subgênero *Viannia* as espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana são agrupadas no “complexo *Leishmania brasiliensis*”.

Neste grupo encontramos a *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*. O subgênero *Leishmania*, é composto pelo “complexo *Leishmania mexicana*”, que compreende espécies causadoras da leishmaniose cutânea (ou cutâneo-difusa) do Novo Mundo (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) garnhami*); pelo “complexo *Leishmania donovani*”, cujas espécies são causadoras da leishmaniose visceral (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* ou *chagasi*); e pelas *Leishmanias* cutâneas do Velho Mundo (*L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*) (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A *Leishmania amazonensis*, principal alvo dos nossos estudos, encontra-se distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), nas regiões Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) do Brasil e em outros países da América (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Este parasito é responsável pela leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa anérgica, uma forma mais rara da doença. Apresenta como características numerosas erupções nodulares não ulceradas em amplas áreas da pele. A leishmaniose cutânea disseminada intermediária ou *boderline* também foi descrita como sendo causados pela *L. amazonensis*. Esta manifestação clínica pode ser observada em até 2% dos casos e, no caso de infecções causadas por *L. amazonensis*, somente após 6 meses do desenvolvimento das lesões primárias, ocorre a disseminação do parasito e o surgimento de pápulas-eritromatosas ou lesões cutâneas ulceradas (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

5.1.2 Ciclo de vida e infecção

Os flebotomíneos são vetores de vários patógenos, incluindo arbovírus e bactérias, mas são mais conhecidos como os principais vetores de protozoários do gênero *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). As fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas e alimentam-se de sangue em diferentes hospedeiros mamíferos para desenvolver os ovos e se reproduzir. Entretanto, tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de seiva, onde adquirem açúcares vegetais e, consequentemente, bactérias que vivem na planta (SANT’ANNA et al., 2012). As larvas dos flebotomíneos se alimentam de detritos e outros compostos orgânicos. Assim as larvas são expostas à uma gama de bactérias, sendo que a maioria destas sofrem biodegradação durante a fase de pupa e a carga bacteriana diminui três dias após atingir a fase adulta (SANT’ANNA et al., 2014).

As fêmeas dos flebotomíneos adquirem amastigotas de *Leishmania* de hospedeiros infectados e a metaciclogênese, ocorre no intestino médio destes insetos. A *Leishmania* reside

permanentemente no intestino dos flebotomíneos, assim, possíveis interações microbiota-parasito podem ocorrer entre a comunidade microbiana do intestino e a *Leishmania* (GUERNAOUI et al., 2011, KELLY et al., 2017). A comunidade bacteriana é dependente da distribuição geográfica do inseto vetor, e cada população geograficamente distinta pode ter diferentes bactérias (MALEKI-RAVASAN et al., 2014). A diversidade bacteriana do intestino tem efeitos significativos sobre os flebotomíneos, podendo aumentar ou inibir a atividade parasitária (GUERNAOUI et al., 2011, KELLY et al., 2017).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são propagados e mantidos por um ciclo de vida complexo entre o parasito, os vetores e os hospedeiros mamíferos, incluindo humanos, cães e roedores (WHO, 2016, KARIMKHANI et al., 2016). O homem participa do ciclo evolutivo da *Leishmania spp.* como um hospedeiro acidental. Os hospedeiros vertebrados naturais desses protozoários são animais silvestres, como marsupiais e roedores, considerados reservatórios desses microorganismos (REY, 2001). A *Leishmania* possui um ciclo de vida dimórfico, que compreende promastigotas extracelulares no inseto vetor e amastigotas intracelulares no interior do VP em macrófagos de mamíferos hospedeiros (MURRAY et al., 2005). Os dois principais estágios de desenvolvimento replicativo no ciclo de vida da *Leishmania* são o promastigota pró-cíclico, que ocorre no inseto-vetor, e a amastigota, que reside no fagolisossomo dos macrófagos de mamíferos. A forma promastigota é alongada (medindo entre 12 – 20 μm) com flagelo livre a partir da sua porção anterior. Já a forma amastigota, é arredondada ou oval (medindo entre 2,5 – 3,5 μm) com flagelo curto. (DOMINGUEZ et al., 2003; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A existência da *Leishmania* em hospedeiros vertebrados requer a expressão de variadas moléculas de superfícies, conhecidas como fatores de virulência, que impedem a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, permitindo sua sobrevivência e progressão no ambiente fagossomal (CHANG; MCGWIRE, 2002). As famílias de moléculas de superfície presente nas formas promastigotas, gp63 (glicoproteína de 63 KDa) e fosfoglicanas, são os principais ligantes para a adesão aos macrófagos (HANDMAN; BULLEN, 2002; ISNARD et al., 2012). A gp63 (ou leishmanolisina) é uma zincometaloprotease envolvida com os processos de entrada, fagocitose e sobrevivência no macrófago (RUSSELL, 1987, BRITTINGHAM et al., 1995). Esta enzima degrada proteínas da matriz extracelular durante a invasão de tecidos e cliva o componente C3b do Sistema Complemento em C3bi, impedindo a lise das promastigotas (BRITTINGHAM et al., 1995). No interior dos fagolisossomas, a gp63 também degrada enzimas lisossomais. A família de

fosfoglicanas de *Leishmania* compreende as proteínas fosfoglicosiladas e proteoglicanas, e os glicolípideos como o lipofosfoglicano (LPG), molécula de superfície dominante nas formas promastigotas. A biogênese do fagolisossomo é retardada pelo LPG, permitindo que as formas promastigotas, mais vulneráveis ao ambiente hidrolítico e ácido do fagolisossoma, se diferenciem em formas amastigotas capazes de se desenvolverem e se multiplicarem no meio ácido (LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006). A estrutura do LPG varia entre as espécies de *Leishmania*, mas é constituído principalmente de unidades repetitivas de um dissacarídeo e um fosfato, ligado a membrana através de uma ancora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). A expressão de LPG, no entanto, é reduzida nas formas amastigotas (YAO et al., 2010).

O ciclo de vida se inicia no momento do repasto sanguíneo, quando dípteros do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (HANDLER et al., 2015) ingerem formas amastigotas juntamente com o sangue e/ou linfa intersticial de um indivíduo infectado.

O sangue ingerido é rapidamente envolvido por uma matriz quitinosa secretada pelas células epiteliais do intestino do inseto vetor, a matriz peritrófica. Essa matriz composta por proteínas, glicoproteínas e quitina, cria uma barreira contra a rápida difusão das enzimas digestivas, limitando a exposição dos parasitos a essas enzimas (PIMENTA et al., 1997). No interior dessa matriz, formas amastigotas se diferenciam em promastigotas, que são protegidas pelo LPG contra as proteases no interior do intestino do inseto. A ruptura da matriz ocorre pela ação enzimática da gp63, liberando os parasitos (TUON; NETO; AMARO, 2008). As formas promastigotas procíclicas se ligam através do flagelo, também por ação do LPG, às microvilosidades intestinais do inseto evitando sua excreção. Elas conseguem aderir ao vetor e durante a migração para as partes bucais se transformam em formas metacíclicas infectivas. Ao atingir a probóscide, as formas metacíclicas são regurgitadas e introduzidas na derme do hospedeiro vertebrado, quando o inseto realiza um novo repasto sanguíneo. Essa regurgitação é resultado do bloqueio do lúmen do intestino anterior do inseto e da válvula estomodeu pelo PSG (*promastigote secretory gel*), o qual melhora a eficiência de transmissão do parasito (STIERHOFF et al., 1999). Fatores imunomodulatórios e outros componentes salivares são regurgitados junto com os parasitos, modulando as respostas do hospedeiro. A *Leishmania* em conjunto com esses fatores, é fagocitada pelos neutrófilos, células dendríticas e, especialmente macrófagos presentes no tecido dérmico (HANDLER et al. 2015).

As formas promastigotas metacíclicas existem apenas transitoriamente dentro dos mamíferos. Após a sua inoculação, essas devem evitar a destruição pelo sistema imune inato de seus hospedeiros mamíferos, a fim de se diferenciar em amastigotas. As promastigotas também

precisam contornar as propriedades antimicrobianas dos componentes do soro antes de serem internalizados pelos macrófagos (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). Laskay e colaboradores (2003) sugeriram que neutrófilos poderiam atuar como “Cavalos de Tróia”, ajudando formas promastigotas de *L. major* e *L. amazonensis* a estabelecer residência intracelular em macrófagos. Neutrófilos infectados foram induzidos a sofrer apoptose, sendo posteriormente fagocitados por macrófagos adicionados à cultura. Como a fagocitose de neutrófilos apoptóticos não ativa vias de defesa em macrófagos (RAVICHANDRAN; LORENZ, 2003), as cargas de promastigotas são transportadas para o macrófago de forma segura e eficiente (LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Assim, diferente do que ocorre nos macrófagos, onde os parasitos são capazes de se diferenciar em amastigotas e replicar dentro do VP estabelecendo a infecção, acredita-se que a passagem pelos neutrófilos seja transiente, servindo apenas como um refúgio temporário e seguro (FARIA et al., 2012).

A internalização das formas promastigotas e amastigotas se dá através de endocitose mediada por vários receptores de superfície presentes em células fagocíticas. Os receptores de complemento (CR)1 e CR3 são fundamentais para uma fagocitose “silenciosa”, uma vez que não há indução do *burst* oxidativo e produção da interleucina (IL) 12 (GUY; BELOSEVIC, 1993; FRANCO et al., 2011). Experimentos *in vitro*, mostraram que amastigotas também são internalizadas pelos receptores Fc (*L. mexicana* e *L. major* opsonizadas com imunoglobulinas do hospedeiro vertebrado), receptores heparan-sulfato, receptores de fibronectina CR4 e pelo receptor de manose (MR) (CUNNINGHAM, 2002, HANDMAN; BULLEN, 2002). Além disso, outros receptores de reconhecimento padrão (PRRs) desempenham um papel significativo no reconhecimento desses agentes patogênicos, incluindo os receptores do tipo Toll (TLR), uma família representada por vários membros que reconhecem diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (JANSSENS; BEYAERT, 2003). Os TLRs participam não só da internalização, mas também da ativação das respostas imunológicas inata e adaptativa contra a *Leishmania* (DE VEER et al., 2003, KROPF et al., 2004, GOMES et al., 2009).

Após a internalização, as formas promastigotas metacíclicas são inicialmente encontradas em um fagossoma contíguo à membrana do macrófago. As membranas e o conteúdo do VP mudam à medida que ocorre fusão entre o vacúolo e o retículo endoplasmático (RE), endossomas tardios, lisossomas e outros elementos vesiculares das células hospedeiras, conferindo-lhes propriedades distintas e uma natureza híbrida (RUSSEL et al., 1992, NDJAMEN et al., 2010). Apesar de apresentarem características comuns, o fenótipo do VP

pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania* que ele abriga. No VP da maioria das espécies de *Leishmania*, apenas uma ou duas amastigotas proliferam-se, diferente do que ocorre com o complexo *L. mexicana*, como por exemplo, com a *L. amazonensis*, onde grandes VP abrigam numerosas amastigotas, muitas vezes ligados por seus pólos posteriores à face interna dos vacúolos (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1981). A base molecular do aumento do VP e as consequências para a sobrevivência intracelular desses parasitos ainda não são bem compreendidos. Tem sido proposto que, o alargamento desses VPs pode proteger os parasitos contra os efeitos leishmanicidas da célula hospedeira, diluindo o NO e ROS no interior do VP (WILSON et al., 2008).

A biogênese de ambos os tipos de VP envolve a aquisição de marcadores de membrana presentes em endossomas tardios de células hospedeiras, como proteínas de membrana associadas ao lisossoma (LAMPs), Rab GTPases, catépsinas, próton-ATPases vacuolares e moléculas de MHC de classe II (ANTOINE et al., 1988, KÖRNER et al., 2006). A aquisição desses marcadores é um evento coordenado, necessário para a sobrevivência intracelular e multiplicação dos parasitos, que resulta na maturação do VP. O VP possui pH ácido, variando entre 4,7 e 5,2 (COURRET et al., 2002), devido a presença de numerosas hidrolases lisossomais e o proteínas endossomais/lisossomais, como Rab7, LAMP-1, LAMP-2. (VINET et al, 2009).

Além disso, os VPs exibem moléculas características do retículo endoplasmático, como calnexina e Sec22b (NDJAMEN et al., 2010).

A amastigota dentro do vacúolo sofre sucessivas divisões, levando à ruptura da célula hospedeira e liberação dos parasitos. As formas amastigotas livres também são capazes de invadir outros macrófagos ou serem ingeridas durante um novo repasto sanguíneo pelo inseto vetor completando o ciclo (PIMENTA et al, 1992)

5.2 O gênero *Phlebovirus*: classificação, patologia e transmissão

A família *Bunyaviridae* é composta por mais de 350 vírus divididos em cinco gêneros, dentre os quais *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus* contêm espécies patogênicas para humanos e animais, enquanto que o gênero *Tospovirus* são patogênicos apenas para plantas (WALTER; BARR, 2011, LY; IKEGAMI, 2016). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o gênero *Phlebovirus*, compreende mais de 70 membros, divididos em dois grupos: *Sandfly fever* e *Uukuniemi*. Além dos vírus pertencentes ao grupo *Uukuniemi* não codificarem uma proteína não estrutural (NSm), todos os vírus desse

grupo são transmitidos por carrapatos, enquanto que os vírus do grupo *Sandfly fever* são transmitidos por flebotomíneos e mosquitos (BOULOY, 2011).

Atualmente, os *Phlebovirus* são divididos nos seguintes grupos geneticamente distintos: (i) Flebovirose transmitidas por mosquitos ou flebotomíneos: Rift Valley (RVFV), Nápoles (ex. vírus Toscana: TOSV), Sicilian, Joa (ex. vírus Frijoles: FRIV), Salobo (ex. vírus Icoaraci: ICOV, vírus Belterra), Candiru (ex. vírus Candiru, Alenquer, Itaituba), Punta Toro (ex. vírus Punta Toro: PTV), Salehabad (ex. vírus Salehabad, Arumowot), e Aguacate (ex. vírus Aguacate), (ii) Flebovirose transmitidas por carrapato: grupo Uukuniemi (ex. vírus Uukuniemi: UUKV), grupo Bhanja (ex. vírus Bhanja, Kismayo), grupo Kaisodi (ex. vírus Kaisodi, Lanjan) e grupo Heartland (ex. vírus da febre severa com trombocitopenia: SFTSV, Heartland) (LY; IKEGAMI, 2016) (**Figura 1**).

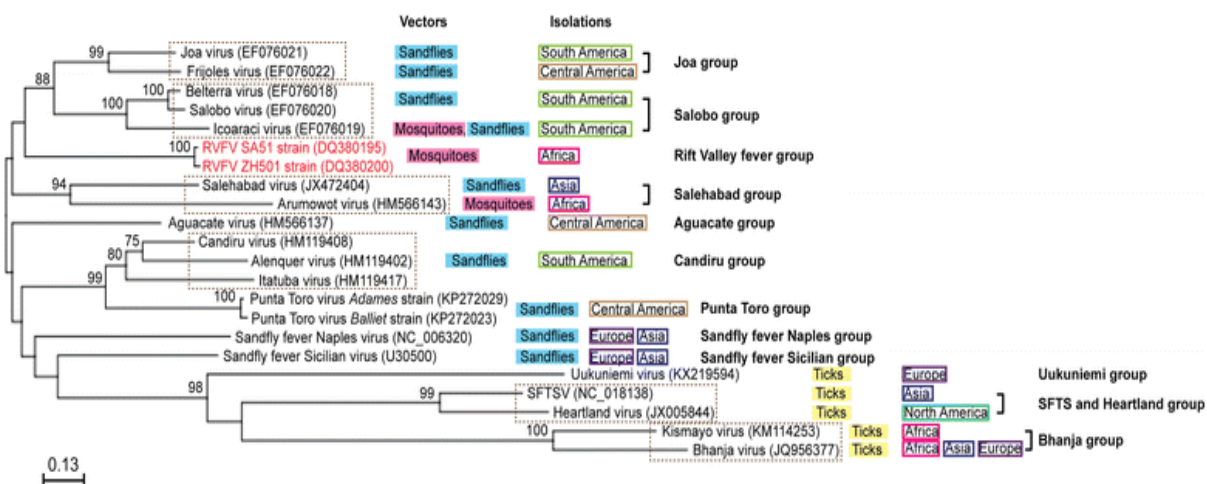


Figura 1: Diversidade genética dos *Phlebovirus* (LI; IKEGAMI, 2016).

A transmissão do grupo *Sandfly fever* aos mamíferos é feita no momento do repasto sanguíneo, pelos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo: grupo Nápoles, Sicilian e Salehabad) ou *Lutzomyia* (novo mundo: grupo Punta Toro, Joa, Salobo, Aguacate e Candiru) (TESH, 1998). Os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia* (WON et al., 2007, HORNE; VANLANDINGHAM, 2014), e a mosca do gênero *Simulium* (PEPIN et al., 2010) também são conhecidos como vetores dos *Phlebovirus*.

Esses vírus, em sua maior parte, causam uma doença febril aguda e autocurável que normalmente, não dura mais de uma semana. No período da Segunda Guerra Mundial, os soldados aliados da região do Mediterrâneo foram frequentemente atingidos pela "febre de três dias", causada provavelmente pelo vírus Sicilian ou Nápoles (DIONISIO et al., 2003; BRETT-MAJOR; CLABORN, 2009). A febre do flebotomo ou febre do *Pappataci* inicia-se de forma

abrupta, com sintomas comuns, como cefaléia frontal, dor lombar, vômitos e com menor frequência, diminuição da consciência e tremores. Os comas são raros (TESH, 1988, BRETT-MAJOR; CLABORN, 2009). Excepcionalmente, o vírus Toscana (TOSV) causa uma doença mais grave, caracterizada por febre intensa, dor de cabeça e meningite asséptica; menos frequentemente, pode ocorrer uma extensão da infecção encefálica (VALASSINA et al., 2003, BRISBARRE et al., 2015). Já o RVFV é altamente patogênico e infecta uma ampla gama de hospedeiros vertebrados. Considerada uma zoonose emergente em muitos países da África Subsaariana e Egito, a infecção por RVFV pode levar a encefalite, retinite ou hepatite fatal associada a febres hemorrágicas. Em ruminantes pode levar a altas taxas de mortalidade, aborto e deformidades fetais (GERDES, 2002, FLICK; BOULOY, 2005).

O SFTSV é transmitido por carrapatos (*Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus microplus* ou *Amblyomma americanum*), e a doença é caracterizada inicialmente por febre aguda, acompanhada de trombocitopenia, leucopenia e diarreia em seres humanos, com taxa de mortalidade de 12 a 30% (VASCONCELOS; CALISHER, 2016). O indivíduo infectado por um *Phlebovirus* é capaz de manter a imunidade contra esse sorotipo específico, mas não estará protegido contra outros sorotipos (Tesh, 1988).

5.2.1 Interações vetor – *Phlebovirus*

Para um mosquito transmitir um arbovírus, os vírions devem infectar o epitélio do intestino médio, escapar para a hemocele para infectar órgãos secundários e ser depositado na saliva para que, no momento do próximo repasto sanguíneo, esse vírus seja transmitido ao próximo hospedeiro (HIGGS, 2004). No entanto, o papel do vírus, do vetor e de fatores ambientais nesses processos, bem como os mecanismos exatos e as rotas dos vírus em um mosquito infectado são menos compreendidos. O bunyavirus transmitido por mosquitos mais bem caracterizado em relação às interações inseto vetor - vírus é o vírus La Crosse (LACV) em seu principal vetor, *Aedes triseriatus*, conhecido por transmitir o vírus por via oral, transovariana e venérea. Após a ingestão de sangue infectado, antígenos virais na porção pilórica do intestino do inseto vetor foram identificados através de ensaios de imunofluorescência. O antígeno foi encontrado em órgãos secundários, incluindo o coração, os gânglios neurais, gordura corporal, glândulas salivares e ovários, o órgão mais importante para a transmissão viral (BEATY; BISHOP, 1988, BORUCKI et al., 2002). As glândulas salivares são os últimos órgãos a serem infectados, e o vírus se replica nesse tecido antes da liberação na saliva (BORUCKI et al., 2002). O antígeno viral estava presente na maioria dos órgãos dos mosquitos machos e fêmeas, e a transmissão venérea foi confirmada pela detecção de LACV

no fluido das glândulas sexuais acessórias de machos infectados (THOMPSON; BEATY, 1977).

Estudos sobre o efeito da genética viral na competência vetorial, ou seja, na capacidade do LACV infectar o intestino do inseto vetor e disseminar-se para a hemocele foi localizada na glicoproteína Gc, codificada pelo segmento M (SUNDIN et al., 1987). Estudos com o RVFV identificaram a importância funcional da proteína NSm na infecção e no mecanismo de escape do intestino médio do inseto vetor. A deleção da NSm induziu a redução das taxas de infecção, disseminação e transmissão em *Aedes aegypti* e menores taxas de infecção em *Culex quinquefasciatus*, quando comparado aos vírus selvagens. Em contraste, a deleção da NSs não teve efeito sobre a infecção ou transmissão no *A. aegypti*, mas a disseminação viral foi reduzida (KADING et al., 2014).

Ensaio de imunofluorescência, imunohistoquímica e microscopia eletrônica têm sido utilizados para investigar os processos de infecção e tropismo tecidual do RVFV. Uma rota proposta para a disseminação do RVFV a partir do intestino médio através da lâmina basal foi via células traqueais associadas com o músculo esquelético e uma lâmina basal modificada, uma vez que estas estavam infectadas em *C. pipiens*. O vírus também pode brotar diretamente na hemolinfa de uma célula muscular infectada (ROMOSER et al., 2004). A cárdia, composta de tecido do intestino médio na junção intestino médio - intestino anterior, também foi implicada na disseminação do RVFV, uma vez que foi consistentemente infectada em *C. pipiens*, além de conter uma lâmina basal modificada que permite a passagem do RVFV (ROMOSER et al., 1992; 2004). O corpo gorduroso, tecido difuso encontrado em todo o mosquito, foi identificado como um local de amplificação do RVFV (ROMOSER et al., 1992), e a infecção desse tecido pode mediar um aumento do título viral antes da infecção da glândula salivar. No *C. pipiens* tanto os lobos laterais quanto os medianos são infectados por RVFV, diferente do que ocorre em outros vetores onde somente os lobos laterais são infectados (ROMOSER et al., 1992). Durante a disseminação viral no inseto vetor, Rosomer e colaboradores propuseram os seguintes eventos: o vírus infecta as células epiteliais do intestino médio para se replicar e entrar no labirinto basal. O vírus pode então infectar outras células epiteliais e escapar através da lâmina basal modificada ou através de uma célula traqueal, ou ainda brotar diretamente na hemolinfa de uma célula muscular infectada, de onde pode se disseminar ainda mais pela hemolinfa ou pelo sistema traqueal. (ROSOMER et al., 2004).

A saliva de insetos hematófagos e carrapatos contém fatores que auxiliam a distribuição do sangue ingerido e possivelmente, a transmissão de patógenos (FONTAINE et

al., 2011). A administração intradérmica de RVFV com saliva ou extrato da glândula salivar de *A. aegypti* ou *A. vexans* em camundongos, aumenta a patogenicidade e a mortalidade dos animais infectados. Curiosamente, quando o RVFV é administrado com o extrato da glândula salivar de *C. pipens*, esses efeitos não são observados. Isso possivelmente ocorre devido a diferenças na composição protéica entre as espécies (LE COUPANEC et al., 2013).

5.3 Resposta imune durante a Leishmaniose

A resolução da leishmaniose depende da capacidade do hospedeiro vertebrado de montar uma resposta imune adequada contra os patógenos invasores. Uma vez que a *Leishmania* foi regurgitada no hospedeiro, uma batalha entre o estabelecimento e erradicação do parasito será iniciada. O paradigma clássico estabelecido para *L. major* é de que a imunidade protetora contra a leishmaniose é mediada pela resposta imune mediada por célula, enquanto a doença não curável é associada a uma forte resposta humoral. Modelos murinos são muito importantes na compreensão da biologia da leishmaniose.

Um trabalho clássico utilizando como modelos experimentais camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c infectados com *L. major*, levou a elaboração do paradigma Th1 e Th2, com produção de IFN- γ e IL-12 ou IL-4 e IL-10 por células T CD4, caracterizando perfis de resistência ou susceptibilidade, respectivamente. Essa dicotomia da resposta imune celular (Th1 ou Th2), entretanto, parece não ocorrer quando a infecção é causada por outras espécies que não a *L. major* (MCMAHONPRATT; ALEXANDER, 2004). No caso da *L. amazonensis*, ocorre uma patologia severa e progressiva independente da linhagem de camundongo utilizada (ABREU-SILVA et al., 2004). Além disso, o pico de replicação da *L. amazonensis* ocorre de forma concomitante ao aumento na produção de IFN- γ , revelando a habilidade que este parasito possui em utilizar mecanismos de defesa do hospedeiro em seu próprio benefício (QI et al., 2004). Estudos em humanos e camundongos sugerem que a imunidade inata e os resultados patológicos durante a infecção por *Leishmania* também são influenciados pela resposta do hospedeiro ao flebotomíneo. Já foi descrito que a saliva do inseto contém potentes vasodilatadores, como o maxadilano e adenosina em *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, respectivamente, que previnem a coagulação sanguínea no local da picada (LERNER et al., 1991, RIBEIRO et al., 1999). O maxadilano também pode atuar inibindo ou modulando a resposta inflamatória e imune de camundongos, sugerindo sua contribuição para a exacerbação da doença (MORRIS et al., 2001). Quando adicionado a cultura de macrófagos murinos, o

maxadilana aumenta as citocinas associadas à respostas do tipo Th2 (IL-10 e TGF- β), mas regula negativamente as citocinas associadas a respostas do tipo Th1 (IL-12p70 e TNF) e NO (BRODIE et al., 2007), favorecendo a progressão da doença.

5.4 Receptores do tipo toll (TLR)

O sistema imune dos vertebrados é constituído pela imunidade inata e a adaptativa, que cooperam para eliminar patógenos invasores com maior eficiência. O sistema imune inato é evolutivamente conservado, proporcionando a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana e é mediada por moléculas efetoras e células que incluem os fagócitos, como macrófagos e DCs (AKIRA; Uematsu; Takeuchi, 2006, BEUTLER et al., 2007, MEDZHITOV, 2007). Estas células são capazes de detectar a infecção microbiana, fagocitar e induzir respostas inflamatórias. Em contraste, a imunidade adaptativa é altamente específica, de longa duração e com memória imunológica, mas é inicialmente desenvolvida em fases tardias da infecção. A detecção desses patógenos é possível devido à uma variedade de receptores que reconhecem PAMP's. Em contraste, a imunidade adaptativa é baseada em receptores de especificidade antigênica. Em oposição à imunidade inata, a imunidade adaptativa, desenvolvida em fases tardias da infecção, se baseia em resposta de longa duração, com a geração de memória imunológica.

Os receptores do tipo *Toll* compreendem uma família de receptores transmembrana do tipo I, que possuem um domínio extracelular rico em repetições de leucina (LRR) e um domínio intracelular do tipo Toll/IL-1 (TIR) conservado (ROCK et al., 1998). Detectam PAMP's na superfície ou no lúmen celular, como endossomos, lisossomos ou retículo endoplasmático (LATZ et al., 2004; NISHIYA et al., 2005). As moléculas microbianas reconhecidas pelos TLRs são polímeros conservados, tais como lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, peptidoglicanos, DNA bacteriano não metilado (sequências CpG), dsRNA/ssRNA viral, entre outros. Os TLRs também são capazes de reconhecer grupos de moléculas presentes nos protozoários, de modo a detectar estes patógenos. O reconhecimento do glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *Trypanosoma cruzi* por TLR2 (CAMPOS et al., 2001), profilina de *Toxoplasma gondii* por TLR11 (YAROVINSKY et al., 2005) e hemozoina de *Plasmodium* por TLR9 (COBAN et al., 2005) são alguns exemplos. Os TLRs também são capazes de reconhecer moléculas endógenas (DAMPs) liberadas durante o dano tecidual ou alguma enfermidade (KAWAI; AKIRA, 2010).

Além dos TLRs, existem os receptores citosólicos como *retinoic acid-inducible gene-I* (RIG-I)-like receptors (RLRs) e *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like receptors (NLRs). Os RLRs pertencem a família das RNA helicases que detectam especificamente espécies de RNA derivados de vírus citoplasmáticos e coordenam programas anti-virais através da produção de IFN do tipo I (YONEYAMA; FUJITA, 2008). Os NLRs constituem uma grande família de receptores que detectam patógenos virais e bacterianos no citosol da célula hospedeira, induzindo a montagem e ativação do inflamassoma. Eles também podem detectar sinais de estresse (MARTINON et al., 2009).

O envolvimento dos TLRs na imunidade inata foi primeiramente descrito na *Drosophila melanogaster*. Christiane Nüsslein-Volhard e Eric Wieschaus (1980) descreveram o *Toll* como um receptor transmembrana necessário para o estabelecimento da polaridade dorso-ventral correta e desenvolvimento embrionário adequado do inseto. Em 1996, Hoffmann e colaboradores observaram que moscas com mutações neste receptor eram susceptíveis às infecções fúngicas, uma vez que mutações no gene *Toll* bloquearam a indução do peptídeo antimicrobiano Drosomicina (LEMAITRE et al., 1996). Em 1997, Charles Janeway e Ruslan Medzhitov identificaram a presença de receptores homólogos ao *Toll* no genoma humano que foram denominados *Toll-like receptors*. Após o reconhecimento de moléculas de patógenos específicas, os TLRs induzem cascatas de sinalização que culminam com a ativação de fatores transcricionais como NF- κ B e membros da família IRF (*IFN-regulatory factor*), que são translocados para o núcleo, promovendo a transcrição e síntese de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IFN- α e IFN- β) e quimiocinas, além da expressão de moléculas coestimulatórias e de moléculas de MHC (KOPP; MEDZHITOV, 1999; BARTON; MEDZHITOV, 2003), moléculas cruciais para a maturação de DCs. A maturação das DCs, é essencial para a indução respostas imunes adaptativas específicas para agentes patogênicos, indicando que os TLRs conseguem fazer uma ligação entre a imunidade inata e a adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004, KAWASAKI; KAWAI, 2014).

O genoma humano codifica dez TLRs (TLR1-TLR10), enquanto que nos murinos são treze (TLR1-TLR9 e TLR11-TLR13) (LEE et al., 2012). Esses receptores funcionam como homodímeros, com a exceção de TLR2 que forma heterodímeros tanto com TLR1 como TLR6 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006, KAWASAKI; KAWAI, 2014). Os homodímeros e heterodímeros de TLR2 estão localizados na superfície da célula, assim como TLR4 e TLR5, enquanto que TLR3, TLR7 e TLR9 são endossomais, permitindo o reconhecimento intracelular de ácidos nucleicos (LEE et al., 2012).

5.4.1 Vias de sinalização dos receptores do tipo Toll

A ligação dos respectivos agonistas aos TLRs provoca o recrutamento de um conjunto de moléculas adaptadoras que contém o domínio TIR, incluindo MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/MAL (*TIR-associated protein/MyD88 adaptor-like*), TRIF (*TIR-domain-containing protein inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (SLACK et al., 2000, TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003, AKIRA; TAKEDA, 2004). Com excessão do TLR3 que utiliza a molécula TRIF, MyD88 é a molécula adaptadora universal essencial para a sinalização dos TLRs (CARTY et al., 2006). TLR4 também pode utilizar TRIF quando é translocado para o endossomo (TANIMURA et al., 2008, KAGAN et al., 2008). MyD88 é recrutada para o domínio de TIR dos TLRs ativados, recrutando IRAK-4 (IL-1R-associated Kinase-4) que ativa e fosforila IRAK-1, que se dissocia de MyD88 e fosforila TRAF-6 (TNFR-associated factor 6), ativando esta proteína. TRAF6 fosforila TAK-1 (TGF β -activated Kinase 1) e sua ativação ativa as quinases IKK α e IKK β , que em conjunto com a subunidade reguladora IKK γ (NEMO), formam o complexo IKK. Este complexo cataliza a fosforilação de I κ B α , culminado com sua poliubiquitinação, degradação via proteassoma e liberação de NF- κ B, que é translocado para o núcleo, onde se liga a uma variedade de regiões promotoras (AKIRA et al., 2006, KAWASAKI; KAWAI, 2014) (**Figura 4**).

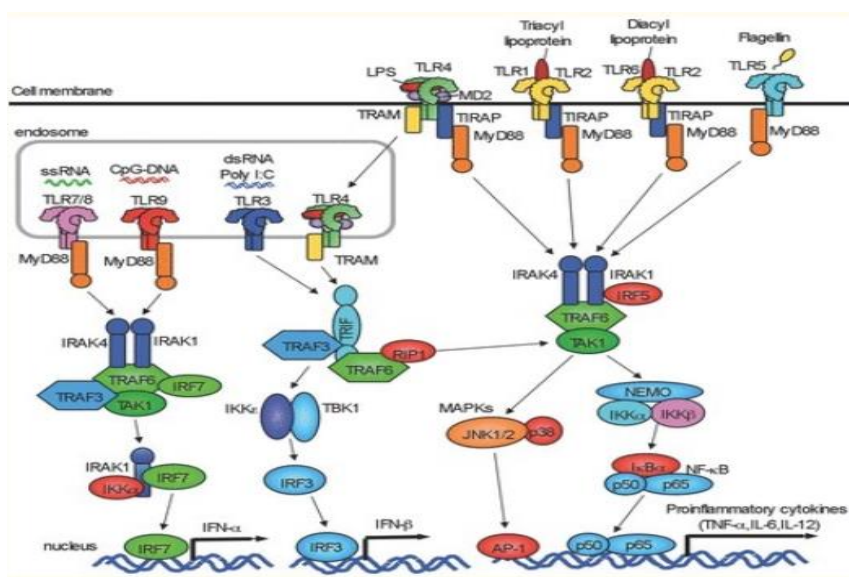


Figura 4: Vias de sinalização intracelular dependentes dos receptores do tipo Toll. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na membrana celular. TLR3, TLR7/8 e TLR9 são expressos em endossomas. Todos os TLRs, exceto TLR3, ativam a via dependente de MyD88 para induzir NF- κ B e ativar p38/JNK. A sinalização via TLR2 e TLR4 exigem TIRAP e MyD88. TLR3 requer TRIF para ativar TBK1/IKK ϵ . Após internalização de

TLR4, ocorre a ativação da via dependente de TRAM/TRIF. A sinalização dependente de TRIF (TLR4 e TLR3) induz a fosforilação do fator transcricional IRF-3 que é translocado para o núcleo levando a produção de IFN- β . TLR7/8 e TLR9 induzem a produção de IFN- α produção através IRF7 (Retirado de SEKI; SCHNABL, 2012).

5.4.2 Interação das *Leishmanias* com os receptores do tipo Toll

Algumas moléculas derivadas da *Leishmania* ativam os receptores do tipo Toll. O primeiro estudo avaliando os TLRs e a infecção por *Leishmania spp.* dependente da via de MyD88, foi realizado por Hawn e colaboradores (2002). Neste estudo, foi avaliada a infecção por *L. major* e a expressão de citocinas em macrófagos de camundongos C57BL/6 *knockouts* para MyD88. Eles demonstraram que a expressão de mRNA para IL-1 α foi menor nos grupos MyD88^{-/-}. Este estudo avaliou apenas a expressão e ativação de promotores de citocinas *in vitro*.

Após um ano, Muraille e colaboradores (2003) demonstraram a importância da via de MyD88 na indução de resistência a lesões cutâneas causadas por *L. major* em camundongos C57BL/6. Camundongos MyD88^{-/-} apresentavam maior número de lesões cutâneas quando comparados aos selvagens, semelhante aos camundongos da linhagem BALB/c, que apresentam dominância da resposta Th2, com tendência a um aumento da gravidade e do número de lesões (MURAILLE et al., 2003). Também houve aumento dos níveis de IL-4 e diminuição dos níveis de IFN- γ e IL-12.

O receptor do tipo Toll 2 também pode ser ativado por componentes estruturais de parasitos do gênero *Leishmania*, como LPG, levando a produção de TNF- α e IFN- γ por células NK (BECKER et al., 2003). Lipofosfoglicano de *L. major* também pode levar a indução de reguladores negativos das vias mediadas por membros da família de SOCS-1 e SOCS-3 (VEER et al., 2003). Chandra e Naik (2008), verificaram que em macrófagos infectados com *L. donovani*, a regulação negativa de IL-12 através da via de sinalização de TLR2 e a produção de IL-10, são consequências da repressão da via das MAPKs e ativação de ERK1/2, respectivamente (CHANDRA; NAIK, 2008). O aumento dos níveis tanto de PKR quanto de IFN- β pela *L. amazonensis* também é mediada pela sinalização de TLR2 endossomal, levando o aumento de SOD1, inibindo a produção de superóxidos e favorecendo a proliferação intracelular da *L. amazonensis* (VIVARINI et al., 2011).

Consistente com a ativação de MyD88, foi demonstrado que TLR4 é requerido para o controle eficiente da *Leishmania* através da indução da iNOS (KROPF et al, 2004). O engajamento de TLR4 também foi demonstrado durante a imunoterapia de animais BALB/c infectados com *L. donovani* e tratados com glicosíngofosfolípídeo (GSPL) de parasitos da mesma espécie. Há indução de IFN- γ através do sinergismo entre TLR4 e linfócitos T

invariantes *Natural Killer* (iNKT), contribuindo para o controle da carga parasitária aguda nos animais infectados (KARMAKAR et al., 2012). O complexo proteoglicolipídio P8 (P8 PGLC), é um gliconjugado expresso por parasitos do complexo *Leishmania mexicana*, que tem sido descrito por provocar a síntese de uma gama de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β por um mecanismo dependente de TLR4, MD2, CD14 e MyD88 (WHITAKER et al., 2008).

A vacinação da linhagem BALB/c com P8 PGLC confere resistência significativa contra *L. pifanoi* e *L. amazonensis*, protegendo esta linhagem susceptível contra a leishmaniose cutânea (COLMENARES et al., 2003, MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

A fosfotirosina fosfatase (SHP1) foi estabelecida como um regulador central na sinalização da via dos TLRs, podendo ser explorada pela *Leishmania* para inibir IRAK-1 (IL-1 receptor-associated kinase 1), incapacitando os macrófagos de responderem a uma grande variedade de estímulos, favorecendo assim a sobrevivência do parasito (ABU-DAYYEH et al., 2008). A SHP1 tem um papel central na regulação da iNOS e consequentemente, na produção de NO. Foi demonstrado que a SHP1 se liga a um motivo conservado de KTIM (*kinase tyrosine-based inhibitory motif*), encontrado em várias quinases que atuam nesta via, e estão diretamente associados com a imunidade inata [além de IKAK-1, as quinases como ERK1 e ERK2 (*extracellular signal-related kinase*) também estão envolvidas]. Estudos realizados com *L. donovani* demonstram que tanto a atividade quanto a expressão de SHP1 é aumentada em macrófagos infectados, contribuindo para sobrevivência do parasito (FORGET et al., 2006).

O reconhecimento da *Leishmania* em compartimentos endossomais também já foi demonstrado. Utilizando como modelo células NK infectadas por *L. major*, foi possível demonstrar produção de citocinas, principalmente IL-12, essencial para o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora, através da ativação da via de TLR9 (LI et al., 2004). Além disso, Flandin e colaboradores (2006) mostraram que TLR3 é necessário para a produção de NO e de TNF- α induzida pela infecção de *L. donovani*, além de contribuir para a fagocitose do parasito.

Finalmente, promastigotas de *L. panamensis* induzem a produção de TNF- α e o aumento da expressão de TLR1, TLR2, TLR3 e TLR4 em macrófagos humanos (GALLEGO et al., 2011).

5.5 PKR

5.5.1 Estrutura, função e ativação de PKR

A proteína quinase R (PKR) é uma serina-treonina quinase, com 551 aminoácidos (DABO; MEURS, 2012) constitutivamente expressa em células de mamíferos, caracterizada

por duas atividades distintas: autofosforilação e a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação da tradução eIF-2 (GAESTEL, 2006). Isso impede a ligação do iniciador Met-tRNA ao ribossomo limitando a replicação viral, por inibir a síntese protéica (WILLIAMS, 1999, 2001). Existem ainda outras quatro quinases nos mamíferos (GCN2, PERK e HRI) que fosforilam eIF-2 em resposta a sinais de estresse ou, principalmente, como resultado de infecções virais (BARBER et al., 2001).

Além da regulação traducional, PKR também possui um papel na transdução de sinais e no controle transcricional através da via I κ B/NF- κ B (KUMAR et al., 1994). Alguns estudos, demonstram que células deficientes em PKR não induzem a produção de IFN- α/β em resposta a poly (I:C) (SMITH et al., 2001, DIEBOLD et al., 2003), corroborando a função biológica de PKR como um agente anti-viral. A atividade de PKR também está relacionada ao controle do crescimento e proliferação celular, atuando como um supressor tumoral (KOROMILAS et al., 1992, MEURS et al., 1993). Além de ser ativada em resposta ao dsRNA de origem viral ou sintética, poliânions como heparina, sulfato de dextrano, sulfato de condroitina e ácido poli-L-glutamina, também podem ativar essa quinase (GALABRU; HOVANESSIAN, 1987). A PKR é ainda ativada por estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas e estresse oxidativo (WILLIAMS, 2001). Como já citado anteriormente, o reconhecimento de dsRNA também pode ocorrer via TLR3 (ALEXOPOULOU et al., 2001, WANG et al., 2004) ou pelas helicases RIG-I (YONEYAMA; FUJITA, 2008) e MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) (KANG et al., 2002).

A expressão de PKR pode ser constitutiva em muitos tipos celulares, mas a exposição de células a IFN do tipo I resulta no aumento dos níveis de PKR, como consequência da ativação transcricional de seu gene (MEURS et al., 1990). O gene *Pkr* humano se localiza no cromossomo 2p e é composto por aproximadamente 17 éxons (KUHEN et al., 1996), e seu promotor contém 503 pares de bases, não apresentando sequências consenso associadas à iniciação da transcrição, como TATA box. A expressão basal e induzida de PKR depende da presença do elemento KCS (*kinase conserved sequence*), que é conservado em relação à sequência e posição relativa do elemento ISRE (*IFN stimulated response element*), em humano e camundongo, e é responsável pela expressão induzida de PKR em resposta a IFN (KUHEN; SAMUEL, 1997). Na ausência de IFN, a indução de PKR ocorre pela da cooperação dos fatores transcricionais sp1 e sp3 que se ligam ao elemento KCS presente no promotor (DAS et al., 2006). Entretanto, a ativação da transcrição de genes induzidos por IFN do tipo I, como PKR,

depende da ligação do fator heterodimérico ISGF (IFN - *Stimulated Gene Factor*) 3 (STAT1, STAT2, and IRF9) ao elemento ISRE (SAMUEL, 2001, WARD; SAMUEL, 2002).

A proteína PKR possui dois domínios com funções distintas: um domínio N-terminal regulatório de ligação a dsRNA e um domínio catalítico C-terminal. O domínio de ligação a dsRNA (*dsRNBD- dsRNA Binding Domain*) compreende a região entre os aminoácidos 1-170 e contém dois motivos de ligação a RNA (*dsRBMs- dsRNA Binding Motifs*) compreendendo aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos cada (WILLIAMS, 1999). A ligação de dsRNA a PKR induz uma mudança conformacional desta quinase, que a libera de uma auto-inibição, expondo assim seu sítio ativo e levando a sua auto-fosforilação (WILLIAMS, 2001).

6. RESULTADOS

6.1 Crescimento intracelular de *Leishmania Amazonensis* é exacerbado em resposta a co-infecção com *Phlebovirus*

Como a resposta antiviral clássica mediada pelo eixo PKR / IFN1 é desencadeada por *L. amazonensis* e a adição de dsRNA ou IFN tipo I às células infectadas resultou no aumento do crescimento do parasita, o grupo previu que as coinfeções com arbovírus podem levar a expressão de PKR sustentada e expressão aumentada de IFN β . Para abordar a hipótese de que a coinfeção viral poderia aumentar a carga de *L. amazonensis*, macrófagos foram co-infectados com *L. amazonensis* e Icoaraci ou Pacuí phleboviruses por 48 horas, e a carga parasitária foi medida. O modelo experimental compreendeu coinfeção com Phlebovirus isolado de roedor silvestre, reservatório de espécies de *Leishmania* no Brasil. Nossos resultados indicam que a coinfeção com Phlebovirus promoveu um índice de infecção mais alto em comparação com a infecção isolada por *L. amazonensis* (Fig. 6A). A coinfeção não alterou a porcentagem de macrófagos infectados (Fig. 6B), mas aumentou o número total de parasitas em coinfeções ICOV em comparação com macrófagos infectados apenas com *L. amazonensis* ou *L. amazonensis* e PACV (Fig. 6C). Os níveis de nucleoproteína viral sintetizada nos macrófagos infectados foram avaliados para confirmar a infecção dos macrófagos pelo ICOV (Fig. 6A Suplementar). A viabilidade das partículas virais liberadas pelos macrófagos também foi avaliada (Fig. 6B Suplementar). Partículas virais infecciosas são capazes de lisar a monocamada de células, formando placas virais. Assim, após 3 dias de cultivo, observamos a formação de placas na monocamada de BHK-21, indicando a infectividade das partículas virais produzidas pelos macrófagos. Considerando que a produção do vírus Icoaraci foi mais moderada que a do Pacui, decidimos continuar o estudo de coinfeção apenas com o vírus Icoaraci.

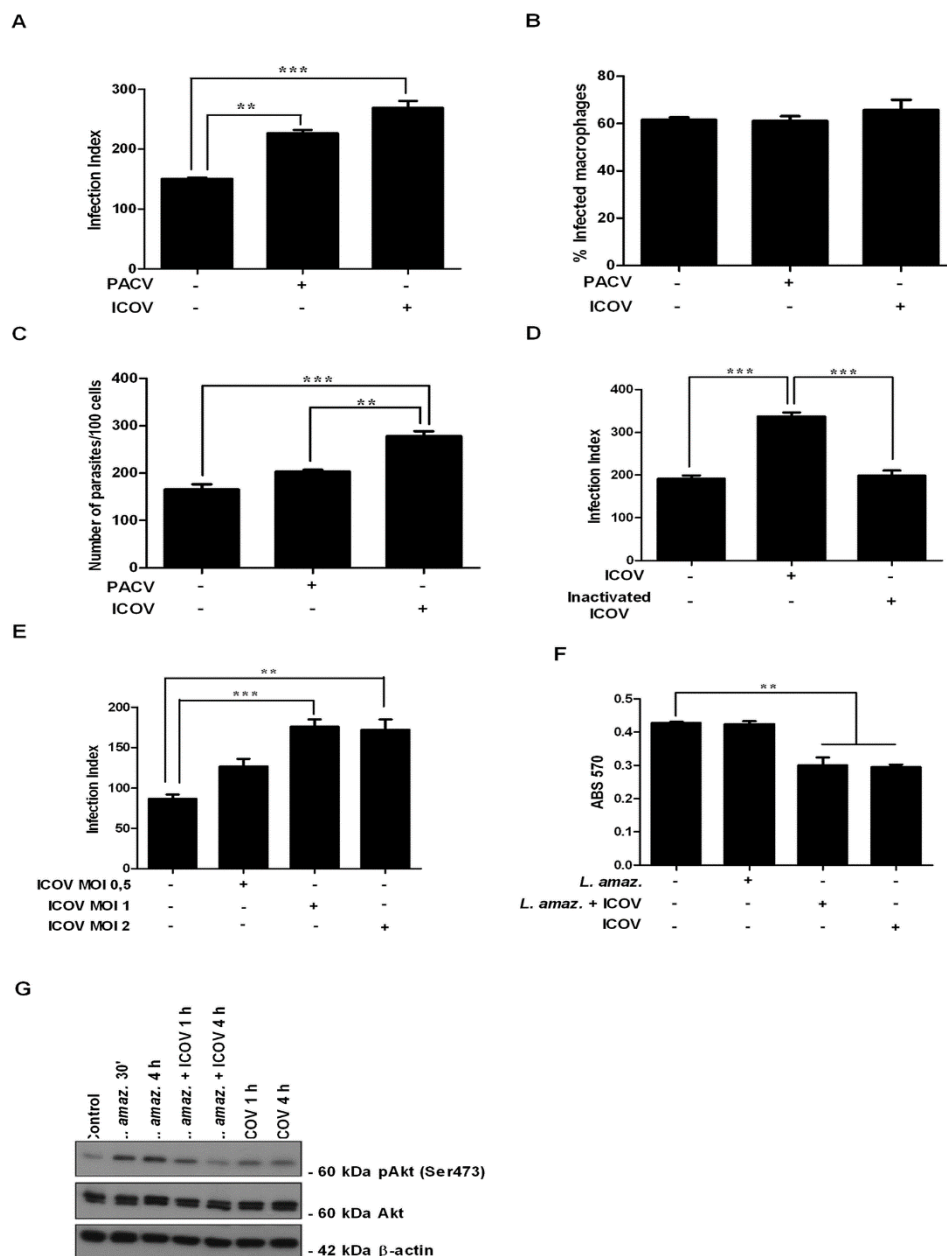


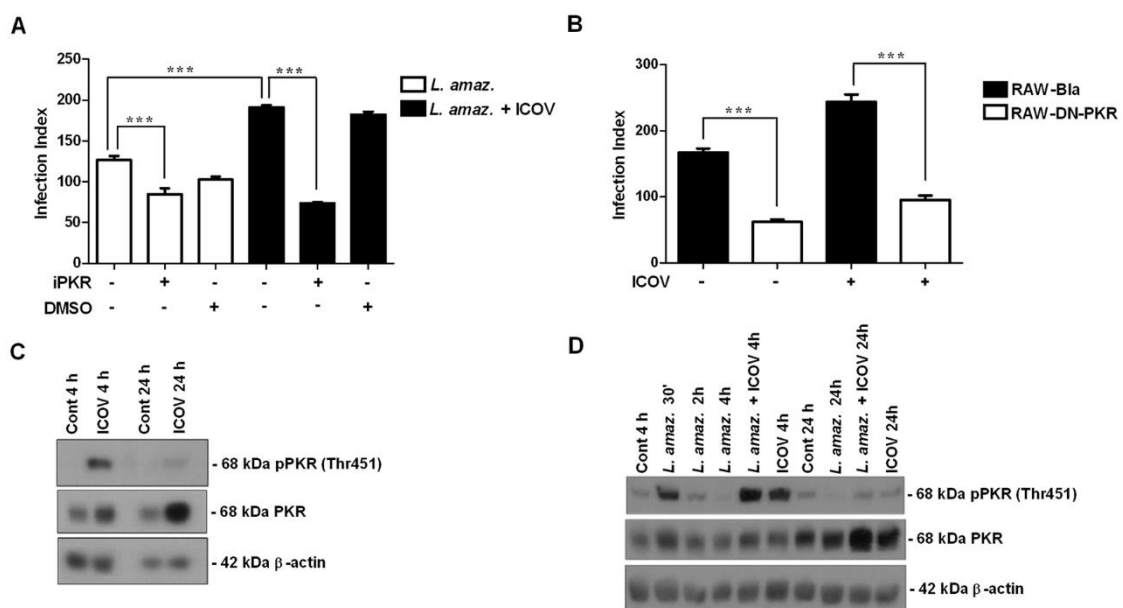
Fig 6. Coinfecção com Phlebovirus da Amazônia potencializa a infecção por Leishmania (L.) amazonensis in vitro

É importante notar que as partículas virais de Icoaraci inativadas por UV não exacerbaram a infecção por *L.amazonensis* (Fig. 6D). Para verificar o MOI viral ideal para o aumento da infecção por *L.amazonensis*, macrófagos peritoneais foram infectados com quatro MOIs virais diferentes (Fig. 6E). Os MOIs de 1 e 2 levaram ao aumento da carga parasitária, mas não observamos diferenças significativas entre os MOIs de 1 e 2. Portanto, escolhemos o MOI de 1 para prosseguir com os próximos testes. Para avaliar se a infecção por Phlebovirus impactaria a viabilidade dos macrófagos, realizamos ensaios de MTT 24 horas após a infecção

(Fig. 6F). Assim, foi observado que o vírus Icoaraci reduz a fosforilação de Akt induzida por *L. amazonensis* 1 h e 4 h pós-infecção (Fig. 6G).

6.2. A infecção por Phlebovirus (Icoaraci) ativa a sinalização PKR e aumenta a infecção por *L. amazonensis*

Como a PKR desempenha um papel fundamental na infecção por *L. amazonensis*, decidiram testar se a PKR foi ativada e necessária para o aumento do crescimento do parasita devido à coinfeção por Phlebovirus. A inibição farmacológica de PKR reduziu a infecção intensificada promovida pela coinfeção com ICOV (Fig. 7A). Este resultado foi ainda corroborado em macrófagos DN-PKR (PKR dominante negativo) co-infectados (Fig. 7B). Esses resultados mostram que a ativação de PKR é necessária para o aumento da infecção por *L. amazonensis* no modelo de coinfeção por Phlebovirus.



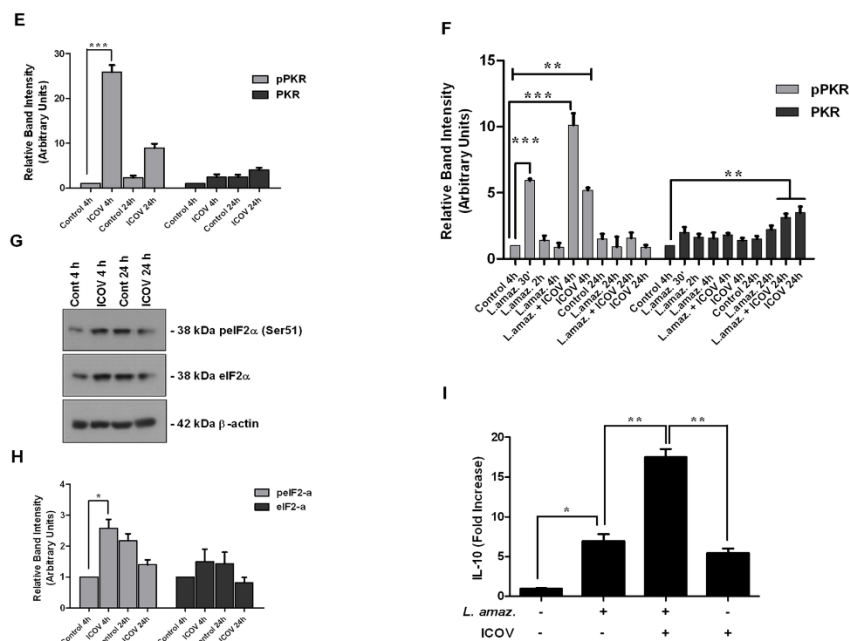


Figura 7. O sensor PKR de RNA de fita dupla é ativado em resposta à infecção por Icoaraci e é necessário para a potencialização da infecção por *Leishmania (L.) amazonensis*.

A proteína NSs (proteína não estrutural codificada no segmento S), é considerada o principal fator de virulência para o Bunyavirus, e desempenha importante papel na evasão da imunidade inata do hospedeiro. Foi relatado que os NSs de RVFV induzem a degradação de PKR por meio do proteassoma como uma evasão da resposta antiviral do hospedeiro.

Decidimos investigar se a infecção por Icoaraci modularia a sinalização de PKR. Os ensaios de Western blot mostram que a infecção por Icoaraci, de fato, ativa a PKR em macrófagos após 4 horas de infecção. Além disso, os níveis de PKR aumentaram tanto em 4 h como em 24 h pós-infecção (Fig 7C), conforme mostrado por densitometria (Fig 7E), indicando que, ao contrário de RVFV e TOSV e semelhante ao vírus Sandfly Fever Sicilian (SFSV), ICOV é não é capaz de degradar o PKR. É importante ressaltar que a infecção por *L. amazonensis* induziu a fosforilação de PKR em macrófagos 30 minutos após a infecção (Fig. 7D). Essa indução foi inversamente proporcional ao tempo de infecção. No entanto, 4 h após a coinfeção, observamos o resgate dos níveis de PKR fosforilados induzidos em resposta ao ICOV. Além disso, os níveis totais de PKR aumentaram em resposta à coinfeção após 24 h, indicando um possível sinergismo entre *L. amazonensis* e ICOV, conforme demonstrado pela densitometria (Fig. 7F). A ativação de PKR foi confirmada pela detecção de eIF2-α fosforilado, um substrato de PKR bem caracterizado (Fig. 7G). O aumento nos níveis de eIF2-α foi observado apenas 4 horas após a infecção e não foi alterado 24 horas após a infecção, conforme mostrado pela densitometria (Fig. 7H). Esses resultados indicam que o ICOV induz e sustenta a ativação de PKR durante a coinfeção com *L. amazonensis*.

A expressão de interleucina-10 é induzida devido à ativação de PKR e está associada a mecanismos leishmanicidas diminuídos em macrófagos infectados. Assim, decidimos investigar se a exacerbação da infecção por *L. (L.) amazonensis* promovida pelo ICOV estava associada ao aumento da expressão de IL-10. A Fig 2I mostra que a expressão de IL-10 foi aumentada na condição de coinfeção em comparação com a infecção única por *Leishmania* ou ICOV.

Em conjunto, este conjunto de resultados apóia a noção de que ICOV sustenta a ativação de PKR, levando a altos níveis de IL-10 e indicando possível sinergismo entre *L.amazonensis* e ICOV.

6.3. A infecção pelo vírus Icoaraci ativa a via de sinalização do IFN tipo I, favorecendo a infecção por *L. Amazonensis*

A importância do IFN β na exacerbação da infecção por *L. amazonensis* induzida por ICOV foi analisada usando macrófagos de camundongos 129Sv / Ev e nocautes para o receptor IFN tipo I (IFNAR - / -). Como esperado, observamos uma redução significativa no índice de infecção de *L.amazonensis* em macrófagos IFNAR - / - em comparação com macrófagos WT. A exacerbação da infecção de *L. amazonensis* pelo ICOV também foi reduzida pela ausência do receptor IFNA (Fig. 8A). Além disso, observamos que tanto a porcentagem de macrófagos infectados (Fig. 8B) quanto o aumento do número de parasitas por célula (Fig. 8C) eram dependentes da via do IFN tipo I. Observamos aumento do índice de infecção durante a coinfeção em comparação com a infecção por *L.amazonensis* (Figura S8A). A porcentagem de macrófagos infectados (Figura S8B) e o número de parasitas por célula (Figura S8C) também aumentaram em resposta à infecção por ICOV.

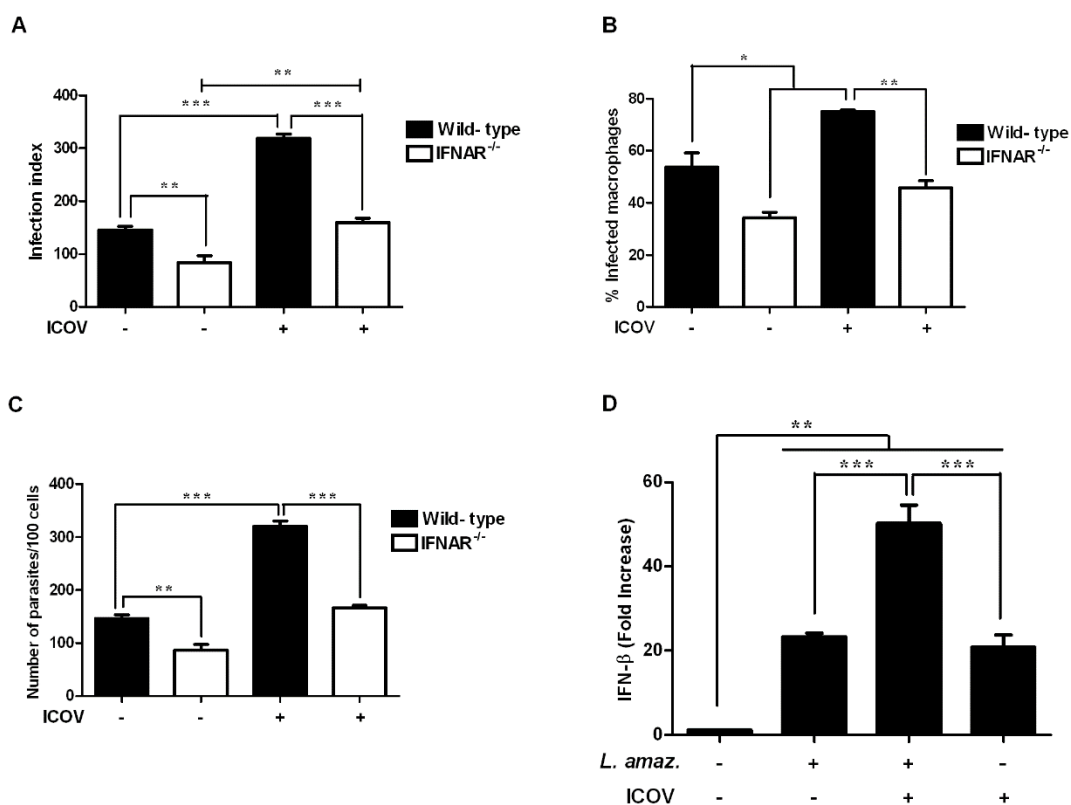


Fig 8. A via de sinalização de IFN Tipo I é necessária para o aumento da infecção induzida pelo vírus Icoaraci.

A importância do IFN β na exacerbação da infecção por *L. amazonensis* induzida por ICOV foi analisada usando macrófagos de camundongos 129Sv / Ev e nocautes para o receptor IFN tipo I (IFNAR - / -). Como esperado, observamos uma redução significativa no índice de infecção de *L. amazonensis* em macrófagos IFNAR - / - em comparação com macrófagos WT. A exacerbação da infecção de *L. amazonensis* pelo ICOV também foi reduzida pela ausência do receptor IFNA (Fig. 8A). Além disso, observamos que tanto a porcentagem de macrófagos infectados (Fig. 8B) quanto o aumento do número de parasitas por célula (Fig. 8C) eram dependentes da via do IFN tipo I. Observamos aumento do índice de infecção durante a coinfeção em comparação com a infecção por *L. amazonensis* (Figura S8A). A porcentagem de macrófagos infectados (Figura S8B) e o número de parasitas por célula (Figura S8C) também aumentaram em resposta à infecção por ICOV.

6.4. A carga do parasita, a progressão da lesão e a expressão de IFN β estão aumentadas em ensaios de coinfeção in vivo

Para validar as observações in vitro, eles infectaram os camundongos com 5×10^6 promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, $2,25 \times 10^5$ PFU de ICOV ou coinfeção

de ambos na planta da pata. A análise das lesões indicou um aumento significativo no tamanho dos animais coinfetados em comparação com os animais infectados apenas com *L.amazonensis* na quarta semana após a infecção. Nos animais infectados apenas com ICOV, não observamos nenhuma lesão (Fig. 8A). Análises histopatológicas das almofadas plantares dos animais infectados com *L. amazonensis* mostraram aparentes infiltrados inflamatórios (Fig. 8B-b). Nos animais infectados com ICOV (Fig. 8B-d), observamos um infiltrado inflamatório discreto próximo ao aspecto normal (semelhante ao observado nos animais sem infecção, mostrado pela Fig 4B-a), enquanto os animais coinfetados apresentaram um intenso infiltrado inflamatório (Fig 8B-c). Conforme previsto, observamos um aumento significativo na carga parasitária nos tecidos dos animais coinfetados (Fig. 8D-b) quando comparados aos animais infectados apenas com *L.amazonensis* (Fig. 8D-a). A densidade de parasitas por macrófagos infectados e co-infectados foi traçada no gráfico (Fig. 8C). Também comparamos a expressão de IFN β (Fig. 10B), iNOS (Fig. 10D) e IL-10 (Fig. 10F) em amostras de tecido obtidas de camundongos infectados com *L.amazonensis* e co-infectados com *L.amazonensis* e ICOV. Observamos um aumento significativo de células positivas para IFN β e IL-10 (Fig. 10B-b e 10F-b) nos tecidos de animais co-infectados quando comparados aos animais infectados apenas com *L.amazonensis* (Fig. 10B-a e 10F-a). O número de células que expressam iNOS foi o mesmo entre as amostras de animais infectados (Fig. 10D-a) e co-infectados (Fig. 10D-b). A expressão de IFN β (Fig 10A), iNOS (Fig 10C) e IL-10 (Fig 10E) por macrófagos foi traçada no gráfico. Esses dados corroboram nossas observações in vitro anteriores e destacam a importância do Phlebovirus e do aumento da expressão de IFN β e IL-10 no agravamento da infecção in vivo por Leishmania.

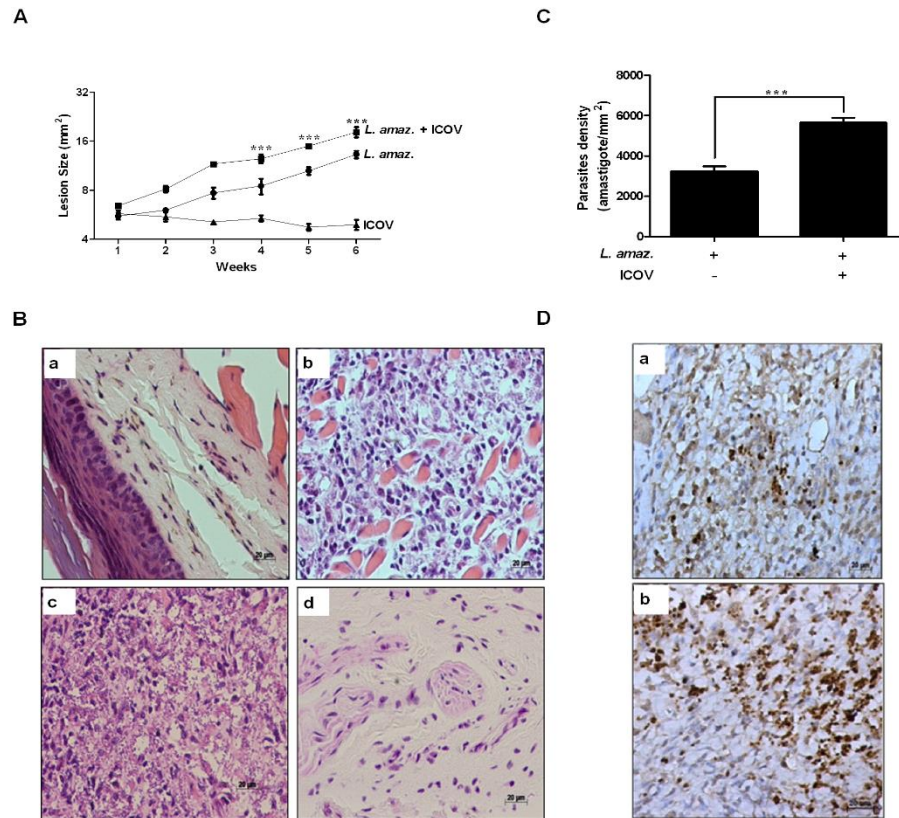


Fig 9. A coinfeção de camundongos com Icoaraci agrava a infecção por *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*.

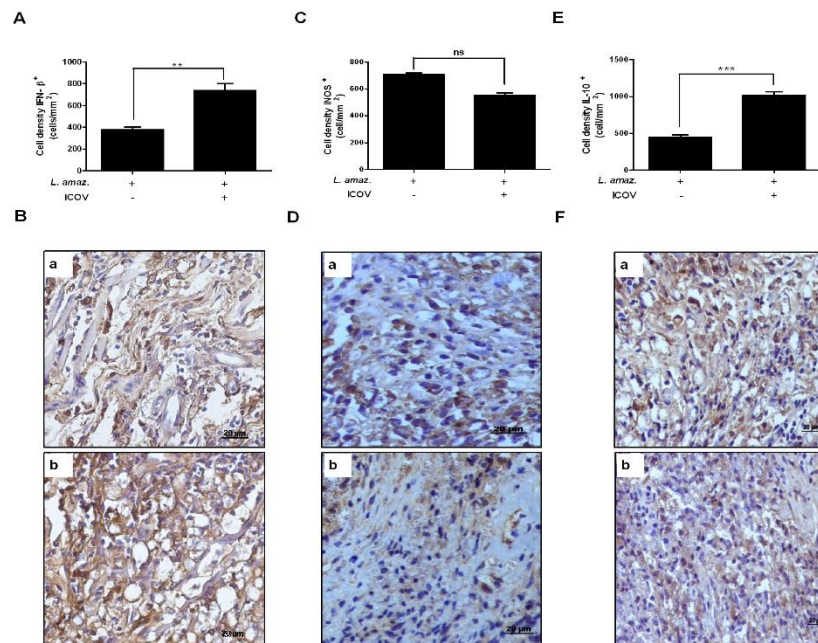


Fig10. A infecção favorável de *L. (L.) amazonensis* durante a coinfeção com o vírus Icoaraci é devido ao aumento da expressão de IFN γ e IL-10.

6.5. A coinfeção com o vírus da dengue 2 (DENV2) não aumenta a carga de *L. Amazonensis*

Nosso objetivo foi questionar se outros arbovírus amplamente transmitidos no Brasil também aumentariam a infecção de *L. amazonensis*. Para responder a essa questão, usamos DENV2 em nossos experimentos porque sua transmissão pode se sobrepor a áreas de leishmaniose tegumentar. Assim, medimos o índice de infecção para verificar se o DENV2 poderia favorecer a entrada, sobrevivência e / ou crescimento intracelular de *L. amazonensis* (Fig. 11A). Não observamos diferenças no índice de entrada ou sobrevivência, 4 h ou 24 h, respectivamente, dos parasitas na coinfeção com DENV2. No entanto, 48 horas após a infecção, surpreendentemente, observamos o efeito oposto ao observado com o ICOV-L. coinfeção com *L. amazonensis*. A proliferação intracelular foi significativamente reduzida em macrófagos infectados com DENV2, indicando que macrófagos co-infectados tiveram uma maior capacidade de reduzir a infecção por *L. amazonensis*.

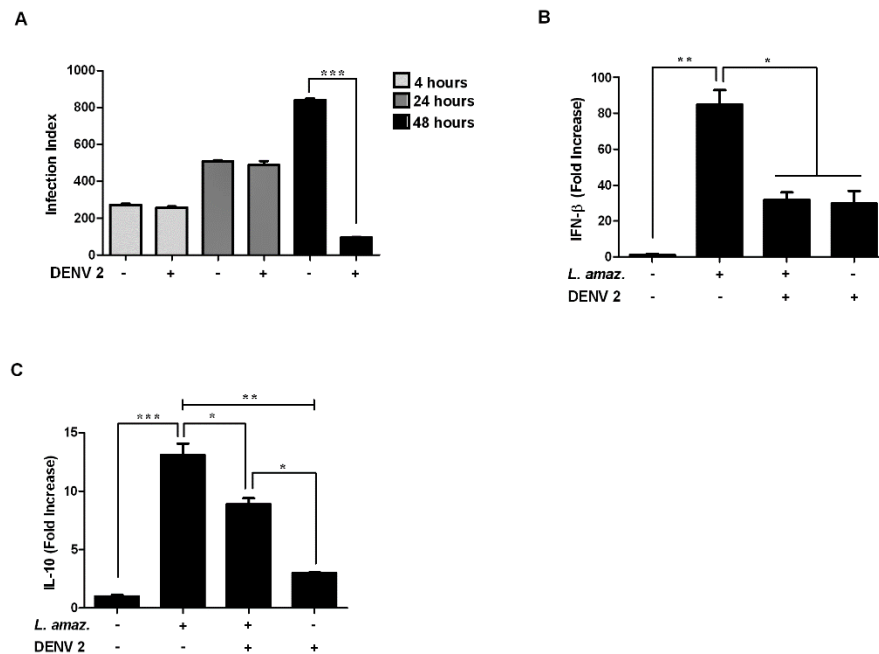


Fig 11. O vírus da dengue tipo 2 modula negativamente o crescimento intracelular de *Leishmania amazonensis* e impede a expressão de IFN β e IL-10 em macrófagos.

Em seguida, avaliamos a expressão de IFN β e IL-10 no DENV2-L. coinfeção *L. amazonensis*, (mostrado na Fig. 11B e 11C, respectivamente). Observamos que em macrófagos co-infectados, a expressão de ambas as citocinas foi reduzida quando comparada a macrófagos infectados apenas com *L. amazonensis*. Esses dados indicam que o DENV2 pode alterar o perfil

de expressão de IFN β e IL-10 induzido em resposta à infecção por Leishmania, o que pode explicar a redução na carga parasitária observada. Esses resultados podem sugerir especificidade do efeito sinérgico na infecção do parasita por flebovírus, que compartilham o ciclo biológico natural da Leishmania.

7. CONCLUSÃO

No trabalho testaram a hipótese de que isolados de Phlebovirus da região amazônica aumentam a infecção por *L. amazonensis* por meio do engajamento do sensor de RNA PKR e da expressão de IFN tipo I e IL-10. Os vírus Icoaraci e Pacuí foram isolados de *Nectomys squamipes* e *Oryzomys sp.*, Respectivamente, reservatórios de *L. amazonensis*, e foram encontrados no mesmo ambiente do vetor *Lutzomyia flaviscutellata*. Nossos dados confirmam observações anteriores da interação entre elementos virais exógenos e endossimbióticos e os efeitos sobre a gravidade da leishmaniose cutânea. No entanto, investigamos com sucesso um modelo de boa-fé putativo compreendendo um Phlebovirus isolado de um reservatório silvestre de *L. amazonensis*, que pode se assemelhar em parte ao contexto de cotransmissão natural.

Além disso, fornecemos novas observações importantes sobre a infecção por ICOV e a interação com *L. amazonensis* in vitro e in vivo.

Nossos dados demonstraram claramente o papel do eixo PKR/IFN1 no aumento da infecção do parasita em macrófagos co-infectados. Ativação de PKR e expressão de IFN β foram observadas devido à infecção de ICOV e provavelmente em sinergia com a indução pela infecção de *L. amazonensis*. Assim, a infecção por Icoaraci não direcionou a degradação ou supressão de PKR da expressão de IFN β , conforme relatado em outras infecções por Phlebovírus. A proteína NSs codificada por algumas espécies de Phlebovirus anula a expressão do interferon tipo I e promove a degradação de PKR. No entanto, os dados preliminares mostram que as sequências de ICOV NSs podem ser bastante divergentes quando alinhadas com as sequências de TOSV NSs, e é concebível que elas possam exibir outras propriedades biológicas. O sequenciamento de ICOV em andamento pode revelar características desconhecidas das proteínas NSs de Phlebovirus do Novo Mundo.

A viabilidade de macrófagos durante a infecção por ICOV ou ICOV/*L. amazonensis* foi reduzida e esse resultado foi corroborado pela descoberta de que o ICOV não ativa a Akt1, que está envolvida na sobrevivência celular. Esta característica distingue nossos resultados dos achados com espécies de Leishmania (*Viannia*) abrigando o simbiote LRV1, que promove a ativação de Akt e sobrevivência prolongada de macrófagos infectados. Não investigamos se a

infecção por Icoaraci promoveria autofagia ou apoptose em macrófagos e se tais eventos estariam relacionados à redução da viabilidade dos macrófagos. Porém, em nosso modelo, o número de amastigotas / macrófagos infectados é alto, e mais estudos são necessários para desvendar os mecanismos de sinalização no modelo de coinfecção.

Nossos estudos in vivo corroboram as observações in vitro e destacam a importância do Phlebovirus e do aumento da expressão de IFN β no agravamento da infecção in vivo por *Leishmania*. Lesões grandes e aumento da carga parasitária foram observados no ICOV-L. (*L.*) *amazonensis* co-infectou lesões em camundongos. É importante ressaltar que o número de células que expressam IFN β foi maior em comparação com a infecção única por *L. amazonensis*.

O infiltrado inflamatório estava aumentado no modelo de coinfecção e pode indicar uma exacerbação da infecção. É concebível que a expressão elevada de IFN tipo I possa definir a patogênese conforme descrito por outros [49]. É importante ressaltar que a expressão de iNOS não foi aumentada em ICOV / *L. amazonensis* co-infectou o tecido da lesão, que pode favorecer a sobrevivência e replicação do parasita.

8. REFERÊNCIAS

- Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. S., Cupolilo, S. M. N., Cardoso, F. O., Souza, C. S. F., & Gonçalves Da Costa, S. C. (2004). Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in mice experimentally infected. *Veterinary Parasitology*, 121(3-4) 179-187.
- Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Westra, E. R., Mottram, J. C., & Olivier, M. (2010). Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infection and Immunity*, 78(6) 2438-2445.
- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*.
- Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. *Methods in Enzymology*, 244 1-15.
- Beaty B.J., Bishop D.H. (1988). Bunyavirus-vector interactions. *Virus Research*, 10:289–301.
- Baum A, Garcia-Sastre A (2011) Differential recognition of viral RNA by RIG-I. *Virulence* 2: 166–169.

- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., ... Isibasi, A. (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2) 65-74.
- Beil, W. J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D. C., & Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 135-142.
- Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R., & Sacks, D. L. (1996). Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(2) 515-26.
- Carrero, J. A., Calderon, B., & Unanue, E. R. (2004). Type I Interferon Sensitizes Lymphocytes to Apoptosis and Reduces Resistance to *Listeria* Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4) 535-540.
- Denise, H., McNeil, K., Brooks, D. R., Alexander, J., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2003). Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infection and Immunity*, 71(6):3190-5.
- Deretic V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunological Reviews*, 240(1):92–104.
- Deretic V, Levine B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 5:527–549.