

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos

Estudos sobre a interação de *Leishmania* RNA virus 1-4 com  
*Leishmania (Viannia) guyanensis*

**Marcus Vinícius Gomes da Silva**

Ribeirão Preto

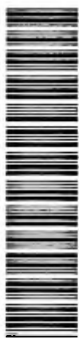
2010

MARCUS VINÍCIUS GOMES DA SILVA



Estudos sobre a interação de *Leishmania* RNA virus 1-4 com  
*Leishmania (Viannia) guyanensis*

DEDALUS - Acervo - FMRP



11200055018

Dissertação de Mestrado apresentada ao departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de *Mestre* em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda Neto

8410  
BIBLIOTECA CENTRAL  
FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO - USP

Ribeirão Preto

2010

Data de Defesa	26/02/10
Dep.:	RBT
Sysno:	1822480

Ficha catalográfica

Silva, Marcus Vinícius Gomes

Estudos sobre a interação de Leishmania RNA Virus 1-4 com *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Ribeirão Preto, 2010.

62p. il., 30cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda Neto

1. *Leishmania* RNA Virus 1-4.
2. *Leishmania (V) guyanensis*.
3. infectividade.
4. patogenicidade.

SILVA, M. V. G. **Estudos sobre a interação de Leishmania RNA Vírus 1-4 com *Leishmania (Viannia) guyanensis***. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

*Banca Examinadora*

Prof. Dr. Eurico Arruda

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luiz Ricardo O. Tosi

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

## *Agradecimentos*

Chegou a hora de agradecer àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Pessoas que me incentivaram de diferentes maneiras. A todos vocês o meu sincero “MUITO OBRIGADO”!

Agradeço ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, com quem tive a sorte de conviver e aprender parte do que apresento neste trabalho. Agradecê-lo é pouco diante de tanta paciência, incentivo, atenção e confiança. Expresso aqui o meu mais profundo reconhecimento.

À Professora Dra. Angela Kaysel Cruz pela co-orientação, pela simpatia, conselhos e disposição em sempre ajudar.

À Tânia A. Defina e Viviane Ambrósio Trombella, técnicas do laboratório da profa. Dra. Angela, pela paciência, ajuda e pelo carinho.

Aos amigos do laboratório de parasitologia molecular: Aline, Eliza, Elton, Karina, Janayna, Juliana, Juliano e Tiago pelo apoio, sugestões e pelos momentos de descontração.

À Monica Cristina Terrão, aluna de doutorado do laboratório de parasitologia molecular pela amizade e pela ajuda essencial em muitos experimentos realizados nesse estudo. Sua ajuda foi fundamental!

À Maria Lúcia Silva (Pitty), técnica do nosso laboratório, pelo imenso carinho!

Aos meus grandes amigos do laboratório de virologia: Alberto, Alcir, Ana Elise, Andrei, André, Ariane, Flávia, Humberto, Izolete, José Luiz (Zezinho), Luana, Marisa, Miriã (Mí), Reginaldo, Rodrigo (doidinho), Rogério (Carioca) e Talita (Bianca) pela ajuda e amizade. Cada um de vocês contribuiu de uma forma especial para esse trabalho. Estou muito feliz em trabalhar com vocês!

Aos amigos do Centro de Pesquisa em Virologia.

À Rosangela e Ana, secretárias do departamento, pela atenção e prontidão em ajudar.

Aos demais funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos pela cooperação.

Aos meus pais, Sebastião e Lúcia, pelo amor e incentivo, sem os quais eu nunca teria chegado até aqui. Impossível expressar em palavras meu amor e gratidão por vocês!

À minha irmã Amanda e aos meus familiares – tios, tias, primos, primas, avó e avô.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

## Resumo

SILVA, M. V. G. **Estudos sobre a interação de *Leishmania* RNA virus 1-4 com *Leishmania (V) guyanensis***. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

Leishmaniavirus (LRV) é um vírus de RNA de fita dupla que infecta persistentemente algumas espécies de *Leishmania*, principalmente os da subespécie *Viannia*. Embora o impacto na saúde pública da leishmaniose nos trópicos seja significativa, muito pouco se sabe sobre os papéis possíveis, se houver, que LRV pode ter sobre a biologia da *Leishmania*, como por exemplo na infectividade e patogenicidade. Este estudo foi conduzido para avaliar a replicação de LRV1-4 durante o ciclo de crescimento de *Leishmania (V.) guyanensis* da cepa M4147, que é naturalmente infectada com LRV1-4 (M4147/LRV1-4). Cultivo de M4147/LRV1-4 em meio sólido permitiu o isolamento de um clone sem LRV1-4 (nomeado clone 40), que foi utilizado como controle negativo. Não houve diferença entre as curvas de crescimento de M4147/LRV1-4 e clone 40. A carga viral de LRV1-4 determinada por PCR em tempo real mostrou que não houve replicação viral durante a fase exponencial de crescimento do M4147/LRV1-4 no estado líquido, mas somente após a fase estacionária de *Leishmania*. Houve uma diminuição progressiva da carga de LRV 1-4 ao longo do tempo durante as passagens de M4147/LRV1-4 na cultura axênica. Comparação de infectividade de macrófagos peritoneais *in vitro* mostrou que o percentual de macrófagos infectados foi significativamente maior para M4147/LRV1-4 (51%) do que para o clone 40 (28%) em 96 horas após a infecção, mas não antes desse tempo. Não houve diferença significativa no número de amastigotas por macrófago infectado. O teste de patogenicidade em coxim plantar de hamster infectados com M4147/LRV1-4 e com o Clone 40 não apresentaram diferenças no tamanho da lesão. LRV1-4 replica-se lentamente em *Leishmania (V.) guyanensis*, sem efeito aparente sobre o ciclo de crescimento do parasita ou de sua patogenicidade na pata de hamster, porém sua presença aumentou a porcentagem de macrófagos peritoneais infectados *in vitro*, sem alteração da carga parasitária.

**Palavras chaves:** *Leishmania* RNA virus 1-4, *Leishmania (V) guyanensis*, infectividade, patogenicidade.

## *Abstract*

SILVA, M. V. G. **Effects of infection by *Leishmania* RNA virus 1-4 on phenotypes of *L. guyanensis***. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

Leishmaniavirus (LRV) is a double-stranded RNA virus that persistently infects some species of *Leishmania*, mainly those of the subspecies *Viannia*. While the public health impact of leishmaniasis in the tropics is significant, very little is known about possible roles, if any, that LRV may have on the biology of *Leishmania*, their infectivity and pathogenicity. These studies were conducted to measure replication of LRV1-4 during the growth cycle of *Leishmania (V.) guyanensis* of the strain M4147, which is naturally infected with LRV1-4 (M4147/LRV1-4). Growing of M4147/LRV1-4 on solid medium permitted isolation of one clone without LRV1-4 (named clone 40), which was used as a negative control. There was no difference between growth curves of M4147/LRV1-4 and clone 40. LRV1-4 load determined by real-time PCR did not increase significantly during the exponential phase of growth of M4147/LRV1-4 in liquid, but only after the stationary phase was reached. There was a progressive decrease in the load of LRV 1-4 over time during passages of M4147/LRV1-4 in axenic culture. Comparison of peritoneal macrophage infectivity in vitro showed that the percentage of infected macrophages was significantly higher for M4147/LRV1-4 (51%) than for clone 40 (28%) at 96 hours post infection, but not before that time. No significant differences in numbers of amastigotes per infected macrophage were noted. The pathogenicity assay in hamster footpad infected with M4147/LRV1-4 or clone 40 showed no differences in size of lesion and parasite load. LRV1-4 seems to replicate slowly in *Leishmania (V.) guyanensis*, without apparent effect on the parasite growth cycle or its pathogenicity in the hamster footpad, but its presence increases the frequency of mouse peritoneal macrophage in vitro infection by the parasite, without change in the parasite load.

**Keywords:** *Leishmania* RNA virus 1-4, *Leishmania (V.) guyanensis*, infectivity, pathogenicity .

## Lista de figuras

Figura 1:	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	p. 13
Figura 2:	Organização genômica do vírus LRV .....	p. 17
Figura 3:	Esquema da estrutura do genoma e expressão das proteínas de <i>Totiviru</i> .....	p. 18
Figura 4:	Ciclo replicativo de L-A vírus em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	p. 20
Figura 5:	Mapa do vetor pGEM-T Easy .....	p. 24
Figura 6:	Curva de crescimento de <i>L. (V.) guyanensis</i> M4147.....	p. 35
Figura 7:	Construção do clone utilizado para curva padrão de LRV1-4 .....	p. 36
Figura 8:	Curva padrão da reação em PCR em tempo real para o vírus LRV 1-4 utilizando diluições seriadas decimais do plasmídeo recombinante .....	p. 37
Figura 9:	Curva de amplificação representativa da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 durante os 8 dias do crescimento de <i>L. (V.) guyanensis</i> em cultura .....	p. 38
Figura 10:	Quantificação absoluta em cópias/500ng de RNA do vírus LRV1-4.....	p. 39
Figura 11:	Quantificação relativa à amostra “Controle LRV” utilizando o gene G6PD de <i>Leishmania</i> como controle endógeno.....	p. 40
Figura 12:	Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de <i>Leishmania</i> .....	p. 40
Figura 13:	Produtos de PCR convencional para o vírus LRV1-4.....	p. 42
Figura 14:	Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....	p. 43
Figura 15:	Curva de crescimento de três culturas de <i>L. (V.) guyanensis</i> M4147.....	p. 44
Figura 16:	Curva de amplificação representativa da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 nas culturas em P1, P10 e do clone 40.....	p. 45
Figura 17:	Quantificação absoluta em cópias/500ng de RNA do vírus LRV1-4 nas passagens P1, P10 e do Clone 40 de M4147 .....	p. 46
Figura 18:	Quantificação relativa à amostra P1 inóculo utilizando o gene G6PD de <i>Leishmania</i> como controle endógeno.....	p. 47
Figura 19:	Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de <i>Leishmania</i> nas amostras P1, P10 e clone 40 de M4147 .....	p. 47
Figura 20:	Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de <i>Leishmania</i> nas passagens P5 e P15 durante o 3º e 7º dia de crescimento de <i>Leishmania</i> .....	p. 48
Figura 21:	Quantificação relativa à amostra P5 inóculo durante o inóculo, 3º e 7º dia de crescimento da <i>Leishmania</i> M4147 .....	p. 48
Figura 22:	Curva de amplificação da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 na cultura do clone 40 .....	p. 49
Figura 23:	Progresso da lesão em hamsters infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i> .....	p. 51
Figura 24:	Porcentagem da cultura de macrófagos BALB/c infectados com as culturas de <i>Leishmania</i> M4147 e do clone 40 .....	p. 52
Figura 25:	Número de amastigotas presentes em 50 macrófagos infectados .....	p. 52



## *Lista de tabelas*

Tabela 1: A família <i>Totiviridae</i> com seus principais representantes .....	p. 14
Tabela 2: Cepas de <i>Leishmania</i> ssp. contendo o vírus LRV.....	p. 16
Tabela 3: Relação de iniciadores para a detecção de LRV1-4 e primers M13 <i>for/rev.</i> ....	p. 28
Tabela 4: Relação de iniciadores para a detecção de LRV1-4 e controle endógeno de <i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) G6PD por tempo real, utilizando o sistema SYBR Green .....	p. 29
Tabela 5: Valores da carga viral média de LRV1-4 por PCR em tempo real.....	p. 39
Tabela 6: Valores da carga viral média de LRV1-4 por PCR em tempo real em P1, P10 e Clone 40.....	p. 46
Tabela 7: Amplificação de LRV1-4 por PCR em tempo real do inóculo de LRV no Clone 40 .....	p. 50

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

- CT** – “*Cycle threshold*”
- dNTPs** – Deoxinucleosídeos trifosfatados
- G6PD** – Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
- ICTV** – Comitê Internacional de Taxionomia Viral
- LRV** – *Leishmania* RNA virus
- mg** - miligrama
- mL** - mililitro
- mM** - milimolar
- μl** - microlitro
- μm** - micrômetro
- μM** - micromolar
- ORFs** – “*Open reading frames*”
- PBS** - Tampão salina fosfato
- PCR** – Reação da cadeia da DNA polimerase
- PFGE** – Eletroforese em campo pulsátil
- RDRP** – RNA-polimerase dependente de RNA
- RNAi** – RNA de interferência
- RT** – Transcrição reversa
- VLPs** – “*Viral-like particles*”
- 5'UTR** – Região não traduzida

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1 O parasita <i>Leishmania</i> .....	12
1.2 Vírus de Protozoários.....	14
1.2.1 <i>Leishmania</i> RNA Vírus.....	14
1.3 O genoma de LRV.....	15
1.4 Replicação viral.....	19
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>23</b>
3.1 Organismos e linhagens .....	23
3.1.1 <i>Leishmania</i> .....	23
3.1.2 Macrófagos.....	23
3.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.2 Curva de crescimento de <i>Leishmania</i> .....	23
3.3 Clonagem .....	24
3.3.1 Vetor para clonagem .....	24
3.3.2 Reação de ligação.....	25
3.3.3 Preparação de <i>E. coli</i> DH10-β eletrocompetente .....	25
3.3.4 Procedimento de transformação .....	25
3.4 Extração de ácidos nucleicos.....	26
3.4.1 Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	26
3.4.2 Extração de RNA .....	26
3.5 Seqüenciamento de DNA.....	27
3.6 Reação de Transcrição Reversa.....	27
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	28
3.7.1 Reação em cadeia da Polimerase convencional .....	28
3.7.2 PCR em tempo real .....	29
3.8 Plaqueamento de <i>Leishmania</i> em meio semi-sólido .....	30
3.9 Preparo de blocos de agarose contendo DNA genômico de <i>Leishmania</i> .....	31
3.10 Eletroforese .....	31
3.10.1 Fracionamento de moléculas de DNA em gel de agarose.....	31
3.10.2 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE).....	32
3.11 Infecção experimental em mamífero.....	32

3.11.1 Modelo de infecção <i>in vivo</i> .....	33
3.11.2 Modelo de infecção em cultura de células .....	33
3.12 Coloração de lâminas .....	34
3.12.1 Panótico rápido.....	34
<b>4 Resultados .....</b>	<b>35</b>
4.1 Crescimento de <i>L. (V.) guyanensis</i> em meio axênico .....	35
4.2 Análise quantitativa do RNA do vírus LRV 1-4 em <i>L. (V.) guyanensis</i> .....	35
4.3 Obtenção de um clone de M4147 sem o vírus LRV1-4.....	41
4.4 Crescimento de M4147 e Clone 40.....	43
4.5 Análise quantitativa do RNA de LRV 1-4 na linhagem M4147 e Clone 40 nas Passagens P1 e P10 .....	44
4.6 O vírus LRV purificado infecta <i>Leishmania</i> ? .....	49
4.7 Infecção experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	50
4.7.1 Infecção em pata de hamster .....	50
4.7.2 Infecção em cultura de células .....	51
<b>5 Discussão .....</b>	<b>53</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>57</b>
<b>7 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>61</b>

# 1 Introdução

## 1.1 O parasita *Leishmania*

Protozoários da família *Trypanosomatidae* são organismos que parasitam hospedeiros vertebrados e invertebrados. Dentro desta família, o gênero *Leishmania* inclui aproximadamente 20 espécies que são patogênicas para o homem (ASHFORD et al.; 1992). Algumas formas clínicas de leishmaniose são endêmicas em áreas tropicais e subtropicais, constituindo importante problema de saúde pública (GRIMALDI; TESH, 1993). Os protozoários causadores dessas doenças são transmitidos ao homem por insetos vetores do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2007).

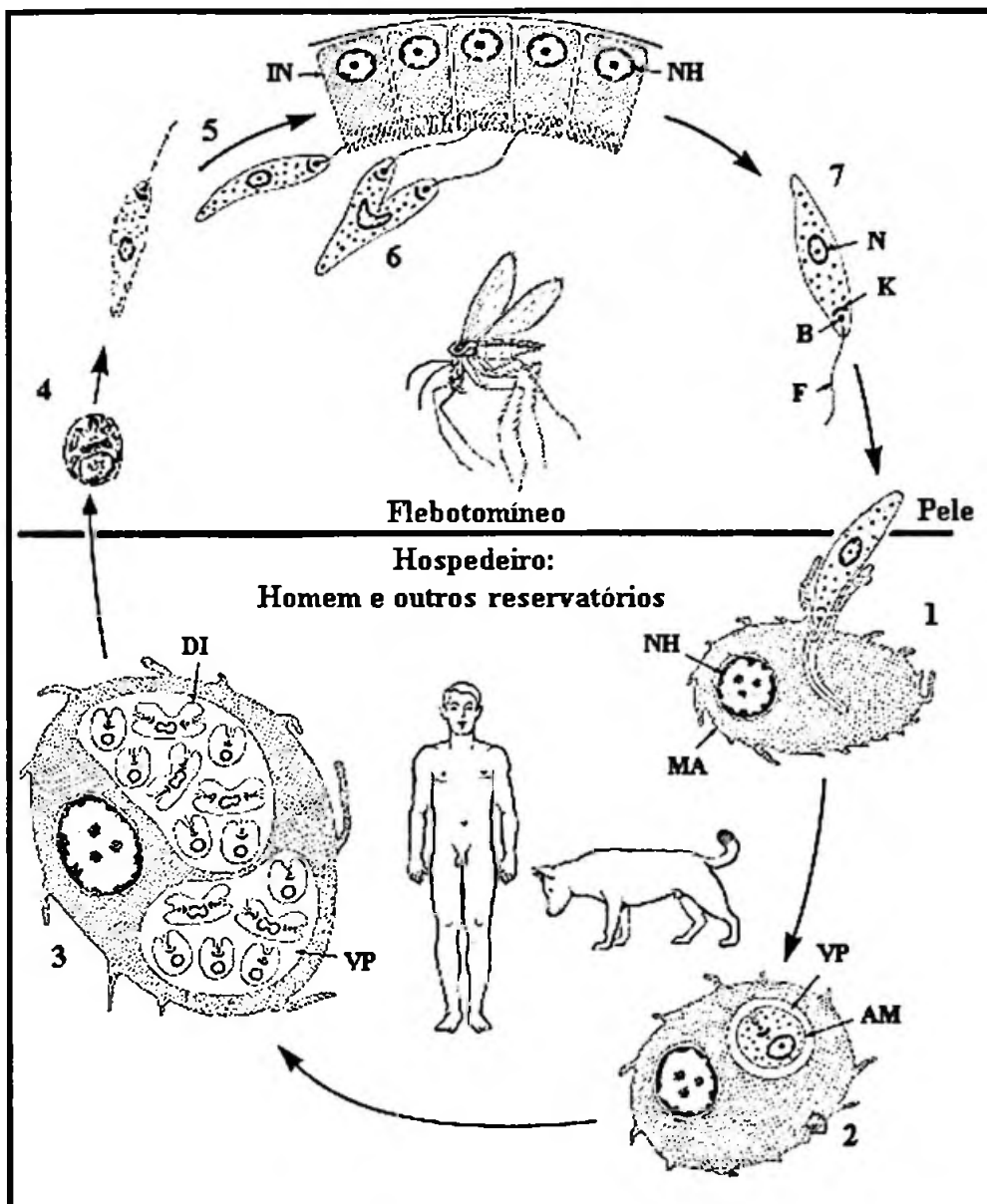
*Leishmania* é um protozoário de ciclo biológico digenético. Além do flebotomíneo, seu hospedeiro intermediário, ele necessita de um vertebrado como hospedeiro definitivo (Figura 1). Em cada hospedeiro o parasita adquire características morfológicas típicas: amastigota intracelular no vertebrado, e promastigota extracelular no flebotomíneo. As promastigotas apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20  $\mu\text{m}$ , com flagelo livre, enquanto as amastigotas têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2  $\mu\text{m}$  e flagelo interno (PESSÔA; MARTINS, 1992).

Ocorrem no Brasil duas formas principais de leishmaniose: a leishmaniose visceral (LV) associada principalmente a *Leishmania (Leishmania) chagasi* e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) associada principalmente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e também a *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*.

No Brasil a leishmaniose visceral é endêmica, mas também ocorrem surtos esporádicos. Está distribuída em 19 dos 27 estados, com maior incidência no Nordeste, onde ocorrem 92% dos casos, seguindo-se as regiões Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro Oeste (1%). Tem-se observado em média 3500 casos por ano no Brasil, com letalidade que pode alcançar 10 % na ausência de tratamento adequado (CONTIJO, 2004; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2007).

A leishmaniose tegumentar americana é, fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres que, pode atingir o homem exposto a focos zoonóticos. São mais acometidos os adultos jovens que desempenham atividades de risco (garimpo, desmatamento, atividades extrativistas), nas regiões Norte e Centro Oeste do Brasil, mas a doença está presente em

praticamente todos os estados, constituindo, portanto, uma das prioridades em saúde pública. Entre 1999 e 2001 foram notificados 34.000 casos anuais de leishmaniose tegumentar americana no Brasil (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2007).



**Figura 1:** Durante a alimentação o vetor inocula os promastigotas que são fagocitados pelos macrófagos da pele do hospedeiro invertebrado (1). Promastigotas sofrem diferenciação para amastigotas entre 1 e 4 horas e se reproduzem por fissão binária dentro do vacúolo parasitóforo (2). Após 48 horas os macrófagos estão cheios de amastigotas e rompem-se, liberando os parasitas que serão fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (3). Quando o flebotomíneo se alimenta de sangue de um vertebrado infectado ele ingere amastigotas (4) que se diferenciam em promastigotas no intestino médio do inseto (5) e se multiplicam por fissão binária. Em seguida os promastigotas migram para a faringe e cavidade bucal, sendo injetados em um novo hospedeiro vertebrado durante a alimentação do mosquito (7). AM, amastigota; B, corpo basal do flagelo; DI, estágio em divisão; F, flagelo livre; VP, vacúolo parasitóforo; IN, célula intestinal; K, cinetoplasto; MA, macrófago; N, núcleo; NH núcleo da células hospedeira (modificado a partir de Parasitology Research and Encyclopedia Reference of Parasitology – <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/>).

## 1.2 Vírus de Protozoários

Vírus de protozoários foram primeiramente descritos em 1960 em *Entamoeba histolytica* (MILLER; SCHWARTZWELTER, 1960 *apud* ARMSTRONG et al.; 1993), por estudos de microscopia eletrônica de “viral-like particles” (VLP). Subseqüentemente, pesquisadores descobriram estruturas semelhantes em uma grande variedade de eucariotos unicelulares. A ampla distribuição de VLPs em eucariotos, tais como *Trypanosoma* spp, *Giardia lamblia* (WANG; WANG, 1986a), *Trichomonas vaginalis* (WANG, WANG, 1986b) e *Leishmania* spp (TARR et al.; 1988; WIDMER et al.; 1989), não é uma grande surpresa, devido à vasta susceptibilidade dos organismos vivos a infecções virais (GUPTA; DEEP, 2007).

### 1.2.1 *Leishmania* RNA Vírus

O *Leishmania* RNA Virus (LRV) pertence à família *Totiviridae*, e ao gênero *Leishmaniavirus*. Esta família abriga três gêneros de vírus de RNA fita dupla: o dos *Totivirus* composto por vírus que infectam fungos, os *Giardiavirus* e *Leishmaniavirus* que infectam protozoários (Tabela 1).

Tabela 1: A família *Totiviridae* com seus principais representantes.

<b>Família <i>Totiviridae</i></b>	
Gênero: <i>Totivirus</i>	Gênero: <i>Leishmaniavirus</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L-A (L1) (ScV-L-A)</li> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L-BC (La) (ScV-L-BC)</li> <li>• <i>Helminthosporium victoriae</i> virus 190S (HvV190S)</li> <li>• <i>Ustilago maydis</i> virus H1(UmV-H1)</li> <li>• * <i>Aspergillus foetidus</i> virus S (AfV-S)</li> <li>• * <i>Aspergillus niger</i> virus S (AnV-S)</li> <li>• * <i>Gaeumannomyces graminis</i> virus 87-1-H (GgV-87-1-H)</li> <li>• * <i>Mycogone perniciosa</i> virus (MpV)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-1 (LRV1-1)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-2 (LRV1-2)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-3 (LRV1-3)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-4 (LRV1-4)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-5 (LRV1-5)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-6 (LRV1-6)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-7 (LRV1-7)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-8 (LRV1-8)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-9 (LRV1-9)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-10 (LRV1-10)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-11 (LRV1-11)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 1-12 (LRV1-12)</li> <li>• <i>Leishmania</i> RNA virus 2-1 (LRV2-1)</li> </ul>
Gênero: <i>Giardiavirus</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Giardia lamblia</i> virus (GLV)</li> <li>• * <i>Trichomonas vaginalis</i> virus (TvV)</li> </ul>	

\*tentativa de classificação no gênero

Classificação segundo ICTV: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs\\_totiv.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_totiv.htm).

O LRV é um vírus de RNA fita dupla (dsRNA) associado com partículas icosaédricas de 30-40 nm de diâmetro, não envelopado. O vírus foi encontrado em 12 cepas de *Leishmania* do Novo Mundo (*L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*) (TARR et al.; 1988; WICKNER, 2001) e em uma cepa do Velho Mundo (*Leishmania (L.) major*) (CADD et al.; 1993; SCHEFFTER et al.; 1995; WIDMER; DOOLEY, 1995) (Tabela 2).

Stuart e colaboradores (1992) foram os primeiros a determinar a seqüência completa do cDNA de um LRV, denominado LRV 1-1, obtido do parasita *Leishmania (V.) braziliensis*. Posteriormente, Scheffter e colaboradores (1994) obtiveram a seqüência completa de um segundo LRV denominado LRV 1-4.

### 1.3 O genoma de LRV

O genoma viral é composto de aproximadamente 5.2 kilobases e possui três “*Open Reading Frames*” (ORFs) na fita positiva (SAIZ et al.; 1998). A ORF2 expressa uma proteína do capsídeo de 82kDa (CADD; PATTERSON, 1994) e a ORF3 apresenta *motifs* característicos de RNA-polimerase RNA-dependente viral (RDRP) (STUART et al.; 1992). Na extremidade 5’ não traduzida (5’ UTR) de isolados de LRV1-1 (STUART et al.; 1992; SCHEFFTER et al.; 1994) e LRV-2 (SCHEFFTER et al.; 1995) existem pequenas ORFs, cujas seqüências de aminoácidos não alinham com nenhuma proteína funcional conhecida (CHUNG et al.; 1994; MACBETH; PATTERSON, 1995) (figura 2). Até o presente momento, apenas 3 genomas completos de LRV estão disponíveis no GenBank ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)). A comparação entre seqüências dos genomas completos de LRV1-1 e LRV1-4 mostrou semelhança de 77% de similaridade nucleotídica, e 92 e 82% de identidade na seqüência de aminoácidos entre as ORF2 e a ORF3, respectivamente. A região 5’ UTR apresenta 450 nucleotídeos e é altamente conservada entre as cepas de LRV1 (LRV1-1 e LRV1-4) (WIDMER; DOOLEY, 1995). Outros sorotipos de LRVs possuem somente a região 5’UTR seqüenciada (LRV1-2, LRV1-7, LRV1-8, LRV1-9, LRV1-10, LRV1-11).

A comparação da RDRP de LRV1 com seqüências homólogas de outros vírus mostrou que a RDRP de L-A/ScV (*Saccharomyces cerevisiae* virus L-A) foi a mais similar. Os *motifs* conservados no gene RDRP de L-A/ScV no fungo, UmV-H1 em *Ustilago*, TvV em *Trichomonas* e em LRV1 sugerem que esses vírus de dsRNA possuíram um ancestral comum (BRUENN, 1993) (Figura 3).



Tabela 2: Cepas de *Leishmania* ssp. contendo LRV.

Espécie	Sorotipos	Cepas de <i>Leishmania</i>	Origem geográfica	Seqüência do genoma
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-1	<i>L. (V.) guyanensis</i> ICN:MHOM/SR/81/CUMC1	Suriname	completo
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-2	<i>L. (V.) braziliensis</i> ICN:MHOM/BR/??/CUMC3	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-3	<i>L. (V.) braziliensis</i> ICN:MHOM/BR/75/M2904	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-4	<i>L. (V.) guyanensis</i> ICN:MHOM/BR/75/M4147	Brasil *	completo
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-5	<i>L. (V.) braziliensis</i> ICN:MHOM/BR/75/M1142	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-6	<i>L. (V.) braziliensis</i> ICN:MHOM/BR/75/M1176	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-7	<i>L. (V.) guyanensis</i> ICN:MHOM/BR/??/BOS12	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-8	<i>L. (V.) guyanensis</i> ICN:MHOM/BR/??/BOS16	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-9	<i>L. (V.) braziliensis</i> ICN:MHOM/BR/75/M6200	Brasil*	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-10	<i>L. (V.) sp.</i> ICN:MHOM/PE/??/LC76**	Peru	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-11	<i>L. (V.) sp.</i> ICN:MHOM/PE/??/LC77**	Peru	5'UTR
	<i>Leishmania</i> RNA virus 1-12	<i>L. (V.) sp.</i> ICN:MHOM/PE/??/LCS6**	Peru	5'UTR
<i>Leishmania</i> RNA virus 2	<i>Leishmania</i> RNA virus 2-1	<i>L. (L.) major</i> ICN: MHOM/SU/73/5-ASKH	Ex-União Soviética***	completo

\* Encontrado na região Amazônica.

\*\* Membros não classificados do complexo *L. (V.) braziliensis* do Peru (ZAMORA, et al 2000).

\*\*\* A origem na distribuição geopolítica atual é incerta (WIDMER; DOOLEY, 1995).

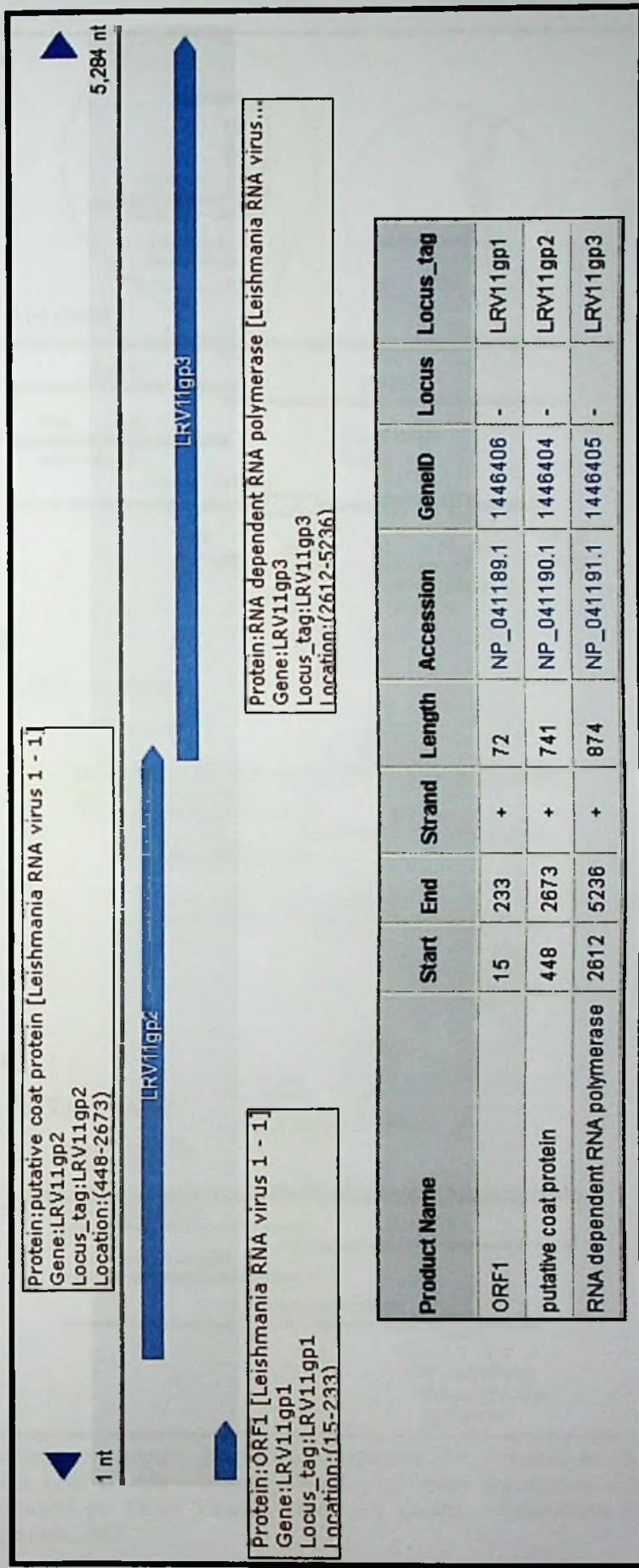
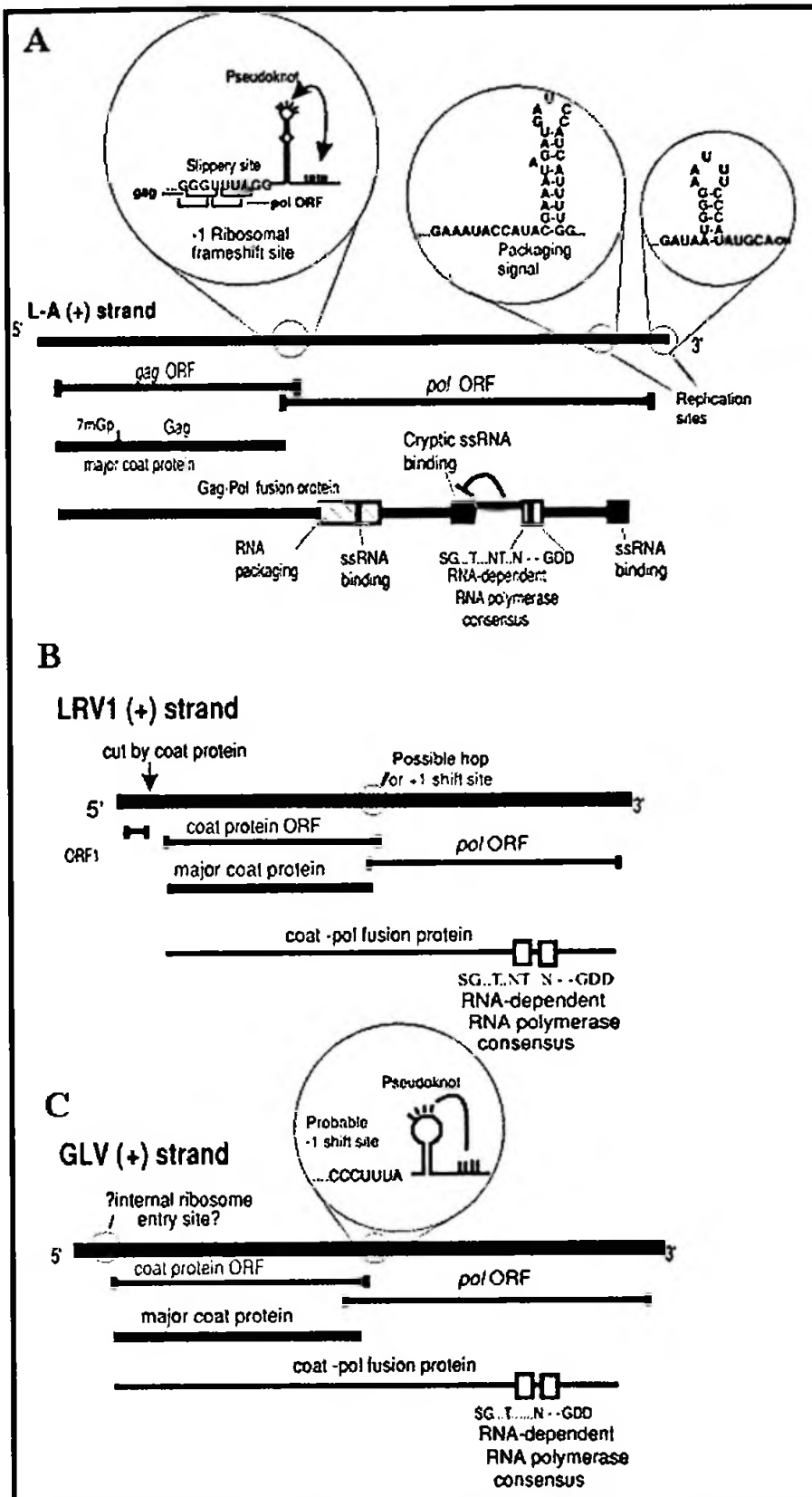


Figura 2: Esquema mostrando a organização genômica do vírus LRV, baseado na linhagem LRV1-1 depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=10283>; data de acesso 09.11.2009). O esquema ilustra as 3 ORFs presentes, mostrando a localização dessas regiões no genoma em pares de bases.



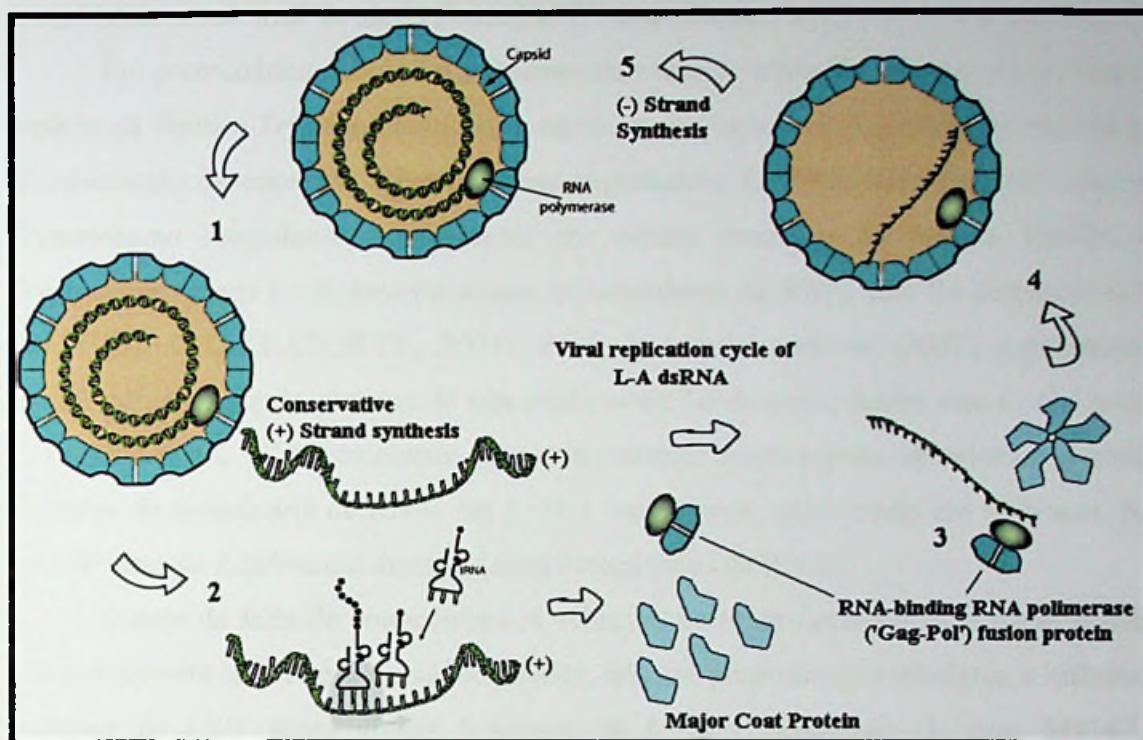
**Figura 3:** Esquema da estrutura do genoma e expressão das proteínas de *Saccharomyces* virus LA (A), *Leishmania* RNA virus 1-1 (B) e *Giardia* virus (C). As várias semelhanças entre eles os classificam como *Totivirus*. Modificado de: Fields *Virology* 5ªed. v. 1 Capítulo: Viruses and Prions of Yeasts, Fungi, and Unicellular Organisms, 2007.

Embora similaridades morfológicas com outros vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) de outros protozoários, o LRV é distinto em muitos critérios. O LRV não é envolto por membrana como o vírus de *T. vaginalis* (WANG; WNAG, 1986a), não é encontrado no núcleo como o vírus de *G. lamblia* (WANG; WANG, 1986b). O LRV, entretanto, mostra semelhanças com o vírus L-A/ScV, tais como, genomas de tamanho similar e não segmentado, restrição ao citoplasma celular, e aparentemente não produzem partículas extracelulares infectantes (WEEKS et al.; 1992).

#### 1.4 Replicação viral

O ciclo de LRV no parasita não é bem conhecido e tem sido considerado semelhante ao do vírus L-A/ScV (WEEKS et al.; 1992) (Figura 4). A replicação inicia-se com a síntese da fita de RNA mensageiro a partir do RNA (-). Uma vez no citoplasma, esta é traduzida em proteínas do capsídeo (*major coat protein*) e proteínas de fusão “*Gag-Pol*” geradas por *frameshift* auterógrado de um nucleotídeo, *frameshift +1*. O domínio *Pol* da proteína de fusão *Gag-Pol* reconhece e liga-se ao RNA positivo. Em seguida, ou concomitantemente, o domínio *Gag* da proteína de fusão se associa as proteínas *Gag* livres no citoplasma levando à encapsidação da fita positiva do RNA. Quando o capsídeo está totalmente montado, a fita negativa de RNA é sintetizada pelo domínio *Pol*, que contem os *motifs* da RDRP, utilizando o RNA positivo como molde.

Apenas uma molécula de RNA de fita dupla é encontrada por partícula viral.



**Figura 4:** Ciclo replicativo de L-A vírus em *Saccharomyces cerevisiae*. (1) Síntese do RNA mensageiro. (2) Síntese das proteínas virais. (3) Domínio Gag da proteína de fusão se associa as proteínas Gag livres no citoplasma levando à encapsidação da fita positiva do RNA. (4) RNA mensageiro (ou fita positiva) totalmente encapsidado. (5) Síntese do RNA (-) pela RNA polimerase RNA dependente. Modificado de: Fields *Virology* 5ªed. v. 1 Capítulo: Viruses and Prions of Yeasts, Fungi, and Unicelular Organisms, 2007.

Ro e Patterson (2000) propõem que a clivagem na região 5'UTR pela proteína de capsídeo seja um mecanismo de controle da quantidade de vírus intracelular. Após a tradução das proteínas dos capsídeo e proteínas de fusão *Gag-Pol*, o RNA fita positiva é clivado a região GAU\*CGAA do 320º nucleotídeo da região 5'UTR pela atividade de endonuclease da proteína *Gag*. Tal clivagem impediria que mais proteínas fossem traduzidas, o número de cópias por parasitas, permitindo a manutenção de infecção persistente pelo vírus LRV.

Um importante aspecto a ser considerado em infecções de eucariotos por vírus de dsRNA ou cujos ciclos envolvam a formação de dsRNA, é o mecanismo de RNA de interferência (RNAi).

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo potente e altamente específico de silenciamento gênico pós-transcricional. É um sistema que atua identificando e degradando especificamente moléculas de mRNA estranhas ao transcriptoma da célula, ou de cuja degradação dependa o desenvolvimento do tecido, ou estado metabólico do mesmo. Uma das

moléculas desencadeantes deste mecanismo é dsRNA gerado na replicação viral, que é reconhecido como sinal de alerta (MILHAVET et al; 2003).

Em protozoários, RNAi foi primeiramente demonstrado em *Trypanosoma brucei*, uma espécie da família *Trypanosomatidae*, e rapidamente tornou-se o método de escolha para o silenciamento da expressão gênica nesses organismos. O RNAi também está presente em *Trypanosoma congolense*, entretanto, em outros membros da mesma família, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, o mecanismo de RNAi não foi detectado (ULLU, TSCHUDI, CHAKRABORTY, 2004). Peacock e colaboradores (2007) publicaram uma análise comparativa do genoma de três espécies de *Leishmania*, dentre elas *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Interessantemente, esses autores observaram a existência de genes da maquinaria de RNAi em *L. (V.) braziliensis*, assim como em *T. brucei*. Não se sabe se vírus de *Leishmania* desencadeiam mecanismos de RNAi.

Diante da falta de conhecimentos sobre os vírus de *Leishmania*, e considerando ser este um parasita importante em saúde pública, nós nos propusemos a averiguar a influência da presença de LRV sobre alguns fenótipos de *L. (V.) guyanensis* da cepa M4147, que sabidamente contém o vírus, bem como quantificar a replicação de LRV ao longo da curva de crescimento deste parasita.

## 2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Quantificar LRV1-4 durante o crescimento da cepa M4147 de *L. (V.) guyanensis*.
- Avaliar diferenças fenotípicas entre a cepa M4147 com LRV1-4 e uma linhagem clonal de M4147 que perdeu o vírus:
  - Curva de crescimento das duas culturas;
  - Modelo de infecção em pata de hamster;
  - Modelo de infecção em cultura de macrófagos;

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Organismos e linhagens

#### 3.1.1 *Leishmania*

Para avaliar o efeito do vírus *Leishmania* RNA virus 1-4 (LRV 1-4) na biologia do parasito, foi utilizada a linhagem de *Leishmania (Viannia) guyanensis* MHOM/BR/75/M4147 (M4147) cedida pelo Instituto Evandro Chagas – Pará/Brasil. Esta linhagem é sabidamente possuidora do vírus LRV1-4.

Promastigotas foram mantidos em meio de cultura M199 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2% urina humana, adenina [100 mM], hemina [10 mg/mL], HEPES [40 mM] (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina N-2 etanosulfônico) (pH 7.4), penicilina [50 unidades/mL] e estreptomicina [50 mg/mL].

#### 3.1.2 Macrófagos

Os macrófagos obtidos de camundongos BALB/c foram mantidos em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> [5%] a 37°C em meio RPMI (RPMI 1640 [1,04%] (p/v), NaHCO<sub>3</sub> [0,2%] (p/v), HEPES [10mM] e glicose [0,45%] (p/v), pH 7,0) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, penicilina [100 unidades/mL] e estreptomicina [100µg/mL].

#### 3.1.3 *Escherichia coli*

Em experimento de clonagem e replicação de plasmídeos foi utilizada como bactéria hospedeira a linhagem de *E. coli* DH10-β.

### 3.2 Curva de crescimento de *Leishmania*

As curvas de crescimento foram realizadas a partir de um inóculo inicial de aproximadamente  $2 \times 10^5$  promastigotas em meio M199 1X, a partir do qual a contagem dos parasitos em contador Beckman Coulter ou câmara de Neubauer foi realizada para a determinação da densidade dos parasitos (KAPLER et al.; 1990). As culturas foram mantidas



em estufa a 26°C e o número de parasitos acompanhados diariamente até que atingissem a fase estacionária de crescimento.

### 3.3 Clonagem

#### 3.3.1 Vetor para clonagem

Para a clonagem de fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usado o vetor de alto número de cópias pGEM-T Easy Vector (Promega®, Madison, WI, USA – figura 5), linearizado com *EcoRV* e acrescido de uma timidina em cada uma das extremidades 3'. Estas timidinas 3' protrusoras no sítio de inserção aumentam a eficiência de ligação de produtos de PCR no plasmídeo porque evitam a recircularização do vetor e fornecem uma extremidade protrusa compatível com produtos de PCR gerados por alguns tipos de DNA polimerases, que freqüentemente inserem uma deoxiadenosina na extremidade 3' dos fragmentos amplificados. O vetor (3015 pares de bases) contém os promotores de RNA polimerase T7 e SP6 flanqueando os sítios múltiplos para clonagem que fica dentro da região codificadora do  $\alpha$ -peptídeo da enzima  $\beta$ -galactosidase. A inativação insercional do  $\alpha$ -peptídeo por clonagem permite a identificação dos clones recombinantes pela coloração das colônias bacterianas transformadas (ZHOU; CLARK; GOMEZ-SANCHEZ, 1995).

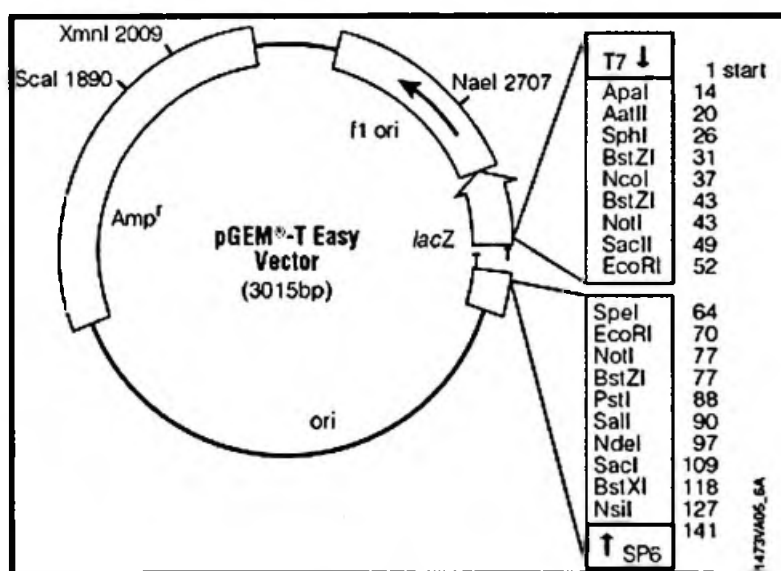


Figura 5: Mapa do vetor pGEM-T Easy Vector (<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>; data de acesso: 07.11.2009).

### 3.3.2 Reação de ligação

O DNA purificado foi utilizado na reação de ligação com 50 ng de vetor pGEM-T easy vector, num volume final de 10  $\mu$ L. A reação ocorreu por 16 horas na geladeira ( $\sim 10^{\circ}\text{C}$ ), em tampão indicado pelo fabricante, na presença de 3 unidades Weiss da enzima fornecida com o kit de ligação.

### 3.3.3 Preparação de *E. coli* DH10- $\beta$ eletrocompetente

A preparação de *E. coli* DH10- $\beta$  foi realizada da seguinte maneira: uma alíquota da bactéria foi inoculada em 3 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB: extrato de levedura 0,5%, triptona 1,0%, NaCl 1,0%, ágar 1,0%) a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Posteriormente 1 mL dessa cultura foi colocado em 200 mL de meio LB e a cultura foi colocada a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 250 rpm até que a densidade óptica ( $\text{OD}_{600}$ ) atingisse 0.6 – 0.8, e a cultura resultante foi centrifugada 4000 xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sedimento resultante foi ressuscitado em 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q gelada e centrifugada a 4000 xg a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes e na última vez o sedimento foi homogeneizado em glicerol 10% gelado e alíquotas de 50  $\mu$ L foram estocadas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . As bactérias foram utilizadas até 15 dias após a sua preparação.

### 3.3.4 Procedimento de transformação

Para a transformação, 2  $\mu$ L da reação de ligação foram adicionados a 50  $\mu$ L de bactérias *E. coli* DH10- $\beta$  eletrocompetentes. A mistura foi homogeneizada e transferida para uma cubeta de eletroporação (fenda de 0,2 cm) e submetida a um pulso nas condições de 25  $\mu$ F (microfaraday) de capacitância; 200  $\Omega$  (Ohms) de resistência e 2,5 kV/cm de voltagem, em aparelho *Gene Pulser* (BioRad). As células foram recuperadas por 1 hora em meio SOB (triptona 2 % (p/v), extrato de levedura 0,5 % (p/v), NaCl [8,5mM]) sem droga de seleção, sob agitação constante de 225 rpm a  $37^{\circ}\text{C}$ . Depois deste período de incubação uma alíquota de 80  $\mu$ L foi espalhada em placas de Petri contendo meio sólido Luria-Bertani (LB: extrato de levedura 0,5%, triptona 1,0%, NaCl 1,0%, ágar 1,0%) acrescido de ampicilina na concentração final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu$ L de X-Gal [50mg/mL] e 20  $\mu$ L de IPTG [0,8M]. As placas foram incubadas por 14-18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . As colônias geradas na transformação foram cultivadas em meio LB líquido para posterior extração de DNA plasmidial.

### 3.4 Extração de ácidos nucleicos

#### 3.4.1 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Para extração de DNA plasmidial em pequena escala, os clones obtidos foram inoculados em 3 mL de meio LB contendo a droga de seleção e incubados a 250 rpm por aproximadamente 16 horas a 37°C. O DNA plasmidial foi extraído a partir da cultura utilizando o método de lise alcalina (BIRNBOIM, DOLY, 1979; SAMBROOK; FRISTSCH; MANIATIS, 1989), como descrito abaixo. Após sedimentar as bactérias de 1,5 mL de cultura, o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensionado em 200 µL de solução I (glicose [50mM], Tris-HCl [25mM] pH 8,0; EDTA [10mM]), certificando-se de que não reste nenhum aglomerado. Foram adicionados 200 µL de solução II (NaOH [0,2 N]; SDS [1%] (p/v)) invertendo-se a mistura até que ficasse transparente, o lisado foi então incubado em gelo por 5 minutos. Após a adição de 200 µL da solução III (acetato de amônio [10M] pH 7,8) as amostras foram misturadas por inversão (~10x) e incubadas por 10 minutos em gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 14000 xg, por 15 minutos a temperatura ambiente (TA) para separar o DNA plasmidial dos restos celulares e do DNA do cromossômico. O sobrenadante, contendo o DNA plasmidial, foi transferido para um novo tubo limpo acrescentando-se 480 µL de álcool isopropílico, que foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos à TA, sendo posteriormente centrifugado a 14000 xg por 10 minutos. O DNA foi precipitado e o sobrenadante descartado. O sedimento de DNA foi lavado com etanol 70% gelado, em seguida centrifugado a 14000 xg por 5 minutos. Depois de seco, o precipitado foi solubilizado em 50 µL de água ultra pura (Gibco) acrescida de 200 µg/mL de RNase A [20mg/mL] (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e incubados a 37°C por 30 minutos. As amostras foram verificadas em gel de agarose e estocadas em freezer -20°C.

#### 3.4.2 Extração de RNA

Aproximadamente  $1 \times 10^7$  promastigotas foram coletados por centrifugação a 2000 xg por 10 minutos a 4°C e homogeneizados por inversão em 700 µL de TRIzol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Após a incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio a cada uma das amostras, agitando-as por 15 segundos e incubando-as por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo

tubo. O RNA total foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol seguido de 10 minutos de incubação a temperatura ambiente e centrifugado a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com etanol 70% (Merck KgaA®, Darmstadt, GER) e centrifugado a 7500 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o tudo permaneceu invertido no fluxo laminar para a secagem do RNA. Depois de seco, o RNA foi solubilizado em água ultra pura (Gibco) e alíquotas de 2 µL foram utilizadas para a quantificação do RNA por espectrofotometria.

### 3.5 Seqüenciamento de DNA

Para determinação da seqüência de nucleotídeos dos clones, foi utilizado um protocolo adaptado a partir do original descrito por Sanger e colaboradores (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). As reações de seqüenciamento foram preparadas utilizando o reagente *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) numa reação com volume final de 10 µL contendo 1 µL de *BigDye*, 1 µL de iniciador [10 µM] (M13-*Forward* ou M 13-*Reverse*) [10 pmoles/µL] e 300-500 ng de DNA plasmidial. As reações foram incubadas por 1 minuto a 95°C e submetidas a 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 segundos, *annealing* a 50°C por 5 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a reação de seqüenciamento a amostra foi precipitada pela adição de isopropanol 65% e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000 xg por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de etanol 70% e após incubação por 2 minutos a temperatura ambiente, procedeu-se nova centrifugação a 2000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o excesso de etanol deixado evaporar por 30 minutos em estufa a 37°C. O DNA precipitado foi solubilizado em tampão formamida *hidi* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) e enviado ao seqüenciador automático *ABI 3100* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

### 3.6 Reação de Transcrição Reversa

As reações de síntese de cDNA foram realizadas seguindo as orientações do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Foram utilizadas 100 a 2000 ng de RNA como molde, 2 µL de random primers, o volume ajustado para 12 µL com água ultra pura (Gibco) e as amostras foram colocadas a 95°C por 5

minutos e em seguida colocadas em gelo por 3 minutos. Foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do tampão de reação [10X RT Buffer], 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTPs mix [100mM], 4,2  $\mu\text{L}$  de água ultra pura (Gibco) e 1  $\mu\text{L}$  da enzima transcriptase reversa. As condições para a síntese do cDNA foram as seguintes: 25°C por 10 minutos e 37°C por 2 horas. Terminada a reação a enzima foi inativada por calor a 85°C por 5 minutos e o cDNA foi imediatamente usado como molde para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou para PCR em tempo real.

### 3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 3.7.1 Reação em cadeia da Polimerase convencional

As ampliações de fragmentos de DNA foram realizados de acordo com protocolo descrito por Mullis e Faloona (MULLIS; FALOONA, 1987), com algumas adaptações, assim as PCRs ocorreram em solução tampão (Tris-HCl [10 mM] pH 8,4; KCl [50 mM];  $\text{MgCl}_2$  [1,5 mM]), contendo a mistura de dNTPs [2 mM] ([0,5  $\mu\text{M}$ ] de cada), [0,2  $\mu\text{M}$ ] de iniciadores, 1 unidade de *Taq DNA polimerase* e 5  $\mu\text{L}$  de cDNA, num volume de 50  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas nas seguinte condições:

Número de ciclos	desnaturação	anelamento	extensão
35 ciclos	95°C por 1 minuto	ver tabela 3	72°C

Foram utilizados os seguintes iniciadores para as reações:

**Tabela 3:** Relação de iniciadores para a detecção de LRV1-4 e primers M13 *for/rev*.

Iniciadores	Seqüência	Alvo	T.A.
LRV1-4 <i>forward</i>	5' ATTCGAGTGGGAGTCCCCC 3'	5'UTR de LRV1-4	58°C
LRV1-4 <i>reverse</i>	5' GATCCTCCACACCGACCGTA 3'	5'UTR de LRV1-4	58°C
M 13 <i>forward</i>	5' GATAAACGACGGCCAG 3'	<i>M13 priming site</i>	50°C
M 13 <i>reverse</i>	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	<i>M 13 priming site</i>	47°C

T.A. – temperatura de anelamento

Após o último ciclo, a temperatura de 72°C (extensão pela *Taq DNA polimerase*) foi mantida por 10 minutos, de modo a garantir que todas as moléculas presentes fossem completamente sintetizadas.

### 3.7.2 PCR em tempo real

Com o objetivo de quantificar relativamente à carga viral do LRV1-4 na cepa M4147, foi otimizado o ensaio de PCR em tempo real em termociclador *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Para tanto, 3 µL do produto sintetizado pela transcrição reversa foi usado como DNA molde para a reação. Foram adicionados 5 pmoles de iniciadores e o tampão de amplificação SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). O volume foi ajustado para 10 µL com água ultra pura (Gibco) e, depois de aquecidos a 95°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas à seguinte condições de amplificação:

Número de ciclos	desnaturação	anelamento e extensão
40 ciclos	95°C por 15 seg.	60°C por 1 minuto

Foram utilizados os seguintes iniciadores para as reações:

**Tabela 4:** Relação de iniciadores para a detecção de LRV1-4 e controle endógeno de *Leishmania (Viannia)* “Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase” (G6PD) por tempo real, utilizando o sistema SYBR Green (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

Iniciadores	Seqüência	Alvo
LRV1-4 <i>forward</i>	5' ATTCGAGTGGGAGTCCCCC 3'	5'UTR de LRV1-4
LRV1-4 <i>reverse</i>	5' GATCCTCCACACCGACCGTA 3'	5'UTR de LRV1-4
LbrM20-V2-0160-G6PD.for	5' CAGATGGAAGCGTGTGATCG 3'	Gene G6PD de <i>Leishmania (Viannia)</i>
LbrM20-V2-0160-G6PD.rev	5' TGCGAGCATAGCCGACA 3'	Gene G6PD de <i>Leishmania (Viannia)</i>

Um clone obtido pela clonagem em pGEM-T Easy Vector (Promega®, Madison, WI, USA) e confirmado pelo seqüenciamento foi utilizado na reação de PCR em tempo real para determinar quantidade relativa e absoluta do vírus LRV1-4 em *L. (V.) guyanensis*.

O produto da extração plasmidial foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm e o cálculo do número de cópias desse plasmídeo por mL foi determinado conforme o cálculo abaixo:

1 mol de 1pb = 660g

Plasmídeo pGEM-T Easy Vector = 3018 pb

Inserto (produto de amplificação com iniciadores LRV1-4 *for/rev*) = 151pb

Plasmídeo + inserto = 3169 pb

1 mol de 3169 bp = 3169 x 660g = 2,1x10<sup>6</sup> g

1 mol de 3169 bp = 2,1x10<sup>6</sup> g = 6,02x10<sup>23</sup> moléculas, de maneira que:

Nº de moléculas =  $\frac{\text{massa da amostra [quantificação no espectrofotômetro]} \times 6,02 \times 10^{23}}{\text{Massa do clone [massa de 1 mol do total de pb (g)]}}$

Nº de moléculas =  $\frac{\text{massa da amostra [quantificação no espectrofotômetro]} \times 6,02 \times 10^{23}}{2,1 \times 10^6}$

A partir do resultado obtido foi possível informar ao software de análise a quantidade, em número de moléculas, que estava presente em diluições decimais desse clone, e assim construir uma curva padrão. A curva padrão foi construída a partir de 10 diluições decimais seriadas do clone constituído pelo vetor pGEM-T Easy mais o inserto resultante da amplificação com os iniciadores LRV1-4 *for/rev*.

A curva padrão possibilitou, por extrapolação, o cálculo do número de cópias/mL do vírus LRV1-4 nos experimento realizados. Os resultados foram analisados com o software *7300 System* com base no valor do CT (“*cycle threshold*”). Esse valor é o ponto que se encontra na fase exponencial da curva de amplificação de uma dada amostra e corresponde ao número de ciclos em que é atingido o limiar de detecção da fluorescência emitida durante a reação de PCR em tempo real.

### 3.8 Plaqueamento de *Leishmania* em meio semi-sólido

O plaqueamento de *Leishmania* em meio semi-sólido tem como objetivo isolar algumas células e gerar clones de isolados. Para isso foram feitas em placas de Petri o meio que consistiu em: para cada 50 mL de meio, 1 parte de meio M199 2X [1X], suplementado com adenina [100 mM], hemina [10 mg/mL], HEPES [40 mM] (ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2 etanosulfônico) (pH 7.4), [50 unidades/mL] penicilina e [50 mg/mL] estreptomicina, 2 mL de urina humana filtrada [4%], 120 µL de biopterina [50µg/mL] e 1 parte de Ágar nobre 2% [1X]. O meio foi vertido em placas e deixado

*overnight* em fluxo laminar para a secagem do meio. Antes de serem usadas, as placas foram colocadas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas.

### 3.9 Preparo de blocos de agarose contendo DNA genômico de *Leishmania*

O preparo do DNA genômico de *Leishmania* em blocos de agarose (*plugs*) tem a vantagem de fornecer um DNA íntegro ao final do procedimento e protegido de degradação posterior. Os *plugs* podem ser utilizados diretamente para verificação do cariótipo molecular por eletroforese em campo pulsátil (do inglês, PFGE), ou tratados com enzimas de restrição antes da eletroforese. Os *plugs* foram tratados da seguinte maneira: células de uma cultura em fase exponencial de crescimento *log* foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos e dispensadas em meio M199 sem SBF de forma a obter 3,5 x 10<sup>8</sup> promastigotas/mL. Essa suspensão de promastigotas foi diluída 1:1 na solução PSG-agarose 1%, preparada pela mistura de volumes iguais, a 42°C, de solução PSG 2X (NaCl [130 mM], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [142mM]; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [8 mM] e glicose 2%) com solução de agarose LMP (*low melting point agarose*) 2%. Ao término do procedimento os *plugs* contêm agarose 0,5%; NaCl [32,5 mM], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [35,5 mM]; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [2 M], glicose 0,5% e 1 x 10<sup>7</sup> promastigotas.

A suspensão final foi distribuída em placas de acrílico com poços de dimensões aproximadas de 0,04 x 0,06 x 0,02 cm (63 µL/poço), mantidas a 4°C por 20 minutos antes dos *plugs* serem excisados e transferidos para a solução de lise (EDTA [0,5mM]; lauril sarcosinato de sódio [1%]; Proteinase K [0,5mg/mL] (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) onde ficaram incubados por 2 dias a 42°C. Os *plugs* foram lavados com solução de Tris-HCl [200 mM] e EDTA [100 mM], por 2 dias, com trocas periódicas a cada 24 horas. Os *plugs* podem ser estocados por anos nesta mesma solução se mantidos a 4°C.

### 3.10 Eletroforese

#### 3.10.1 Fracionamento de moléculas de DNA em gel de agarose

Fragmentos de DNA foram fracionados em géis de agarose preparados em tampão TAE (Tris-acetato [40 mM]; EDTA [1mM]) variando a concentração entre 1 - 1,5%, dependendo do tamanho do fragmento de interesse. As amostras colocadas em gel ocorreu em



tampão TAE na condição de 7 V/cm. Os géis foram corados com brometo de etídeo [0,5 µg/mL] e as bandas de DNA visualizadas por excitação com UV<sub>260nm</sub>.

### 3.10.2 Eletroforese em campo pulsátil (PFGE)

A técnica de PFGE permite a separação de grandes fragmentos de DNA (maiores que 50 Kb) por meio de pulsos alternados de corrente, durante várias horas (SCHWARTZ; CANTOR, 1984; GIANNINI, 1986). O fracionamento de cromossomos lineares de eucariotos unicelulares, que geralmente apresentam cromossomos menores que 5 Mb (megabases), é muito útil para a confecção de cariótipos moleculares de tripanossomatídeos. O cariótipo convencional (por citogenética) não é possível, porque estes microorganismos não apresentam alto grau de condensação dos cromossomos durante a mitose, impossibilitando as técnicas clássicas de citogenética.

Os blocos contendo o DNA cromossômico foram dispostos em gel de agarose 1% e submetido a condições eletroféricas de acordo com a necessidade da faixa de tamanho a ser resolvida. Deste modo, o tempo de corrida e o protocolo de alternância dos pulsos foram programados no aparelho *CHEF DRII* (BioRad): pulsos de 450 a 850 segundos durante 114 horas a 2,5 V/cm. A eletroforese ocorreu com o gel submerso em solução tampão TBE (Tris [0,045M], ácido bórico [0,045M] e EDTA [0,001M], pH 8); a eletroforese foi realizada com temperatura controlada de 11-14°C. Terminada a separação dos fragmentos de DNA, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo [0,5 µg/mL] por uma hora e descorado a seguir por 30 minutos em água milli-Q. Os cromossomos foram visualizadas sob luz UV<sub>260nm</sub>.

### 3.11 Infecção experimental em mamífero

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram obtidos do Biotério de criação Anilab – Paulínea/SP como modelo de infecção *in vivo*. Promastigotas em fase estacionária foram inoculados via subcutânea na região plantar da pata traseira, do lado direito, de 11 animais (por grupo). Medidas do progresso da lesão foram aferidas semanalmente com um paquímetro, usando a pata contralateral não infectada como controle.

Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo 1, infectado com *L. (V.) guyanensis* M4147 selvagem (contem o vírus LRV1-4); grupo 2, clone 40 de *L. (V.) guyanensis* M4147 sem o vírus LRV1-4; grupo 3, animais inoculados com PBS.

### 3.11.1 Modelo de infecção *in vivo*

Das culturas em fase estacionária tardia (3 dias após o final da fase exponencial) foram coletados promastigotas para a infecção de Hamster (*M. auratus*). Os parasitas mortos foram removidos por centrifugação a 1000 xg por 3 minutos a temperatura ambiente. Os promastigotas vivos foram sedimentados por centrifugação a 2000 xg por 10 minutos a 4°C, lavados 2 vezes com PBS [1X] e a densidade de parasitas contados no aparelho Beckman Coulter. O sedimento de células foi ressuspense em volume adequado para que a concentração final igual a  $2 \times 10^8$  promastigotas/mL. As células foram acondicionadas em gelo até o momento da infecção e 25  $\mu$ L desta suspensão celular ( $1 \times 10^7$  promastigotas) foram inoculados, via intradérmica, na região plantar da pata traseira direita do animal.

### 3.11.2 Modelo de infecção em cultura de células

Para averiguar se o vírus LRV1-4 altera a patogenicidade da *L. (V.) guyanensis* as culturas de M4147 e o clone 40 foram inoculados em cultura de macrófagos para análise de diferenças na infecção e proliferação da *Leishmania*. Culturas em fase estacionária tardia (3 dias após o final da fase exponencial) foram coletados promastigotas para a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c. Os promastigotas vivos foram sedimentados por centrifugação a 2000 xg por 10 minutos a 4°C, e ressuspense em meio M199 novo e a densidade de parasitas contados no aparelho Beckman Coulter. A densidade da cultura de macrófagos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Estabelecida a contagem dos parasitos e dos macrófagos, foram utilizados 10 *Leishmanias* para cada macrófago e a mistura foi incubada por 2 horas em *rocker* sob constante agitação. Lamínulas foram lavadas em álcool e flambadas para esterilização das mesmas e colocadas em placas de 24 poços estéreis. As culturas de *Leishmania* e macrófagos foram centrifugadas a 30 xg por 5 minutos a temperatura ambiente e o sedimento resultante foi ressuspense em meio RPMI (RPMI 1640 [1,04%] (p/v),  $\text{NaHCO}_3$  [0,2%] (p/v), HEPES [10mM] e glicose [0,45%] (p/v), pH 7,0) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, penicilina [100 unidades/mL] e estreptomicina [100 $\mu$ g/mL], e colocado 1 mL em cada poço. A placa permaneceu em estufa de atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 33 °C por até 4 dias.

### **3.12 Coloração de lâminas**

#### **3.12.1 Panótico rápido**

Para a coloração dos macrófagos foi utilizado o kit comercial Panótico Rápido LB (Laborclin). O Panótico Rápido LB baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky. A preparação é submetida à ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 1 minuto, e ao final da última imersão encontra-se pronta para a leitura. O reagente 1 compõe-se de uma solução de triarilmetano a 0,1%, o reagente 2 compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1% e o reagente 3 compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

As preparações foram mergulhadas na solução 1 durante 1 minuto e após escorrer o excesso de líquido em papel absorvente foram mergulhadas na solução 2 por 30 segundos e finalmente na solução 3 por 20 segundos sendo lavadas em água destilada. Depois de secas, as lamínulas foram montadas em lâminas com Permount (Fisher Scientific) e então analisadas em microscópio sob objetiva de 40X.

## 4 Resultados

### 4.1 Crescimento de *L. (V.) guyanensis* em meio axênico

O crescimento de *L. (V.) guyanensis* M4147 a partir de uma concentração de  $10^5$  parasitas/mL foi exponencial nos primeiros 3 dias de incubação, atingindo cerca de 3 ordens de magnitude. A partir do terceiro dia, até o oitavo dia, o número de parasitas permaneceu estacionário (Figura 6).

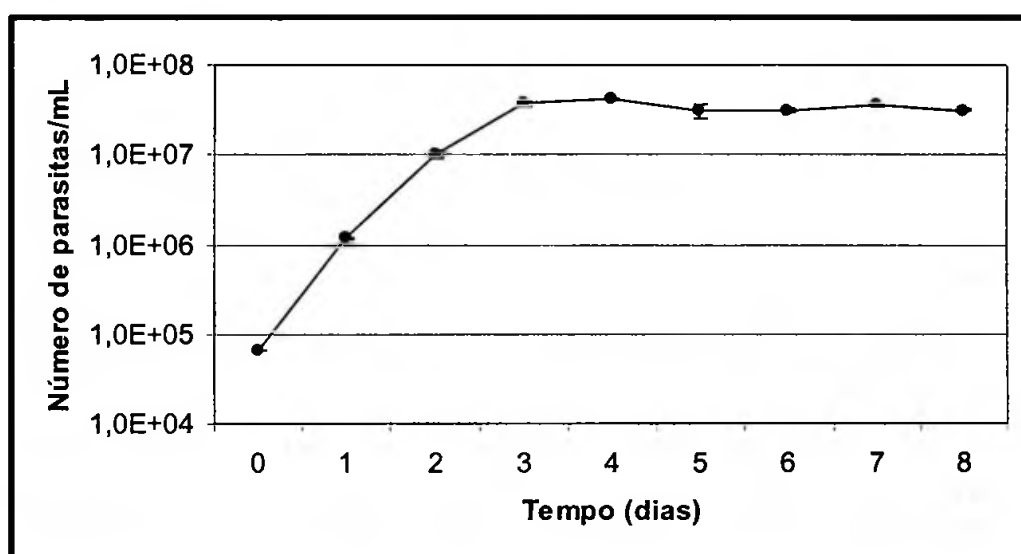


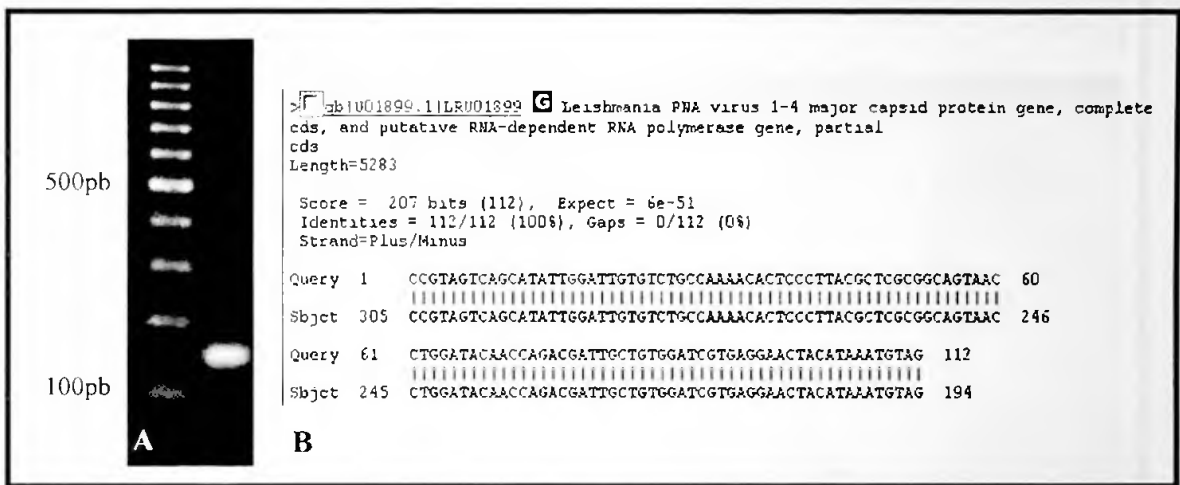
Figura 6: Curva de crescimento de *L. (V.) guyanensis* M4147.

### 4.2 Análise quantitativa do RNA do vírus LRV 1-4 em *L. (V.) guyanensis*

A carga viral foi determinada por PCR em tempo real pelo método de SYBR Green (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) utilizando iniciadores específicos para a região 5'UTR do vírus LRV 1-4. A quantificação foi feita de duas maneiras diferentes: na primeira as amostras foram submetidas a uma quantificação absoluta, que determinou o número de cópias de genoma viral por nanograma (ng) de RNA utilizado, enquanto na segunda a carga viral foi determinada de maneira relativa, por meio da normalização por um controle endógeno de expressão constitutiva o gene G6PD de *Leishmania*. As PCRs em tempo real realizadas neste trabalho foram acompanhadas de controles negativos (somente

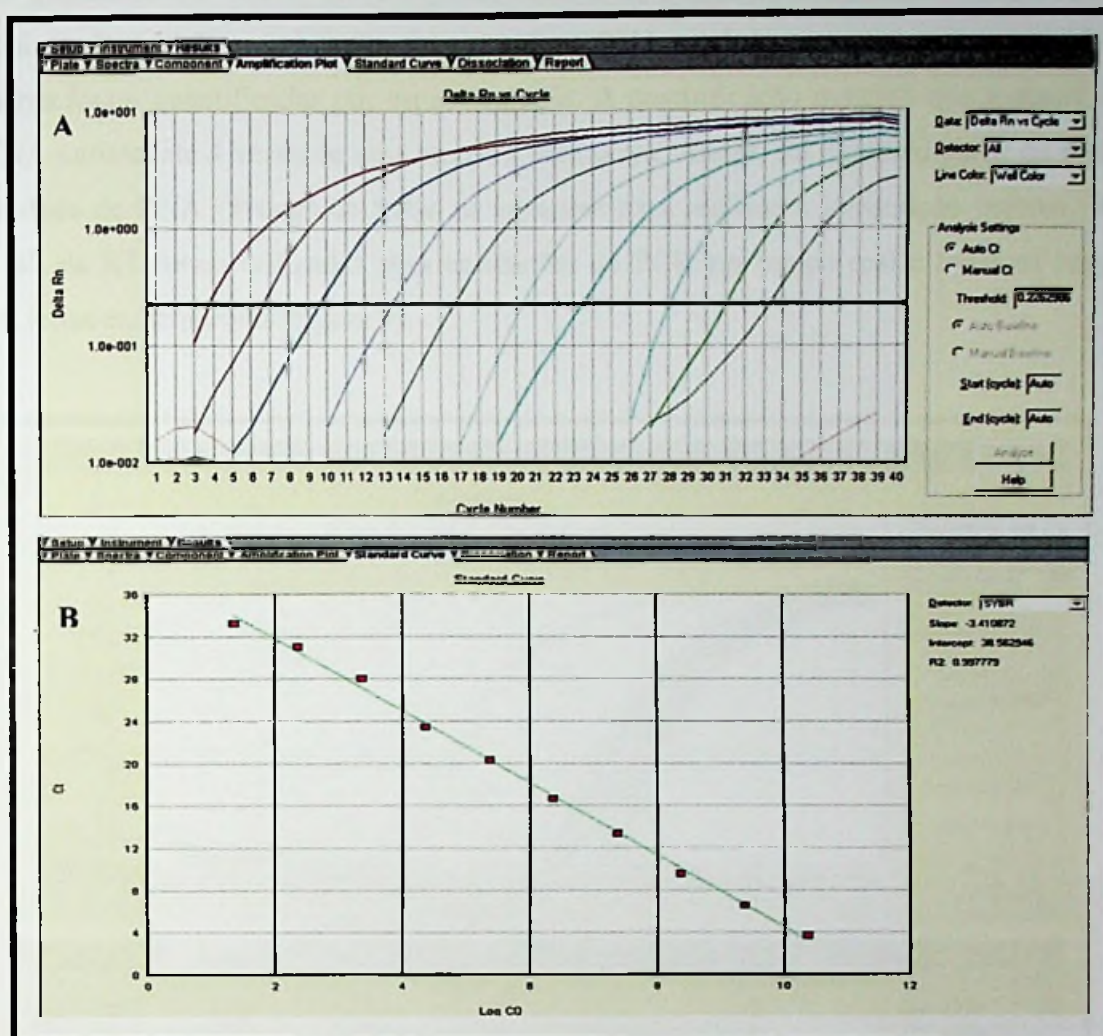
H<sub>2</sub>O no lugar do cDNA) e controles positivos (diluições do clone utilizado para a construção da curva padrão).

Para a quantificação absoluta do vírus LRV1-4 foi utilizada uma curva padrão feita com diluições seriadas decimais de um plasmídeo contendo um cDNA com sítios de anelamento dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real. Esse plasmídeo foi obtido pela clonagem do produto da PCR com os iniciadores LRV1-4 for/rev no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega®, Madison, WI, USA). A identidade do clone utilizado na construção da curva padrão foi confirmado por seqüenciamento com iniciadores M13for/rev (Figura 7).



**Figura 7:** Etapas da construção do clone utilizado para construção da curva padrão de LRV1-4. **(A)** Produto de PCR com iniciadores LRV1-4 for/rev em gel de agarose 1,5% - Marcador de peso molecular de 100pb-Fermentas Internacional Inc. Burlington, CA. **(B)** Blastn do resultado do seqüenciamento do clone gerado pelo produto de PCR da figura A. Blast em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

O clone utilizado para a construção da curva padrão foi quantificado por espectrofotometria e os valores das diluições seriadas decimais foram informados para o software da PCR em tempo real. A análise de quão próximo ficaram os pontos da curva padrão (valor denominado de R2 pelo software) (Figura 8) permitiu determinar a eficiência da PCR em tempo real para o LRV1-4. A eficiência dessa reação foi de 99,77%, o que de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) é extremamente satisfatório.



**Figura 8:** (A) curva padrão da reação em PCR em tempo real para o vírus LRV 1-4 utilizando diluições seriadas decimais do plasmídeo recombinante da clonagem do produto de PCR com iniciadores LRV1-4 for/rev no vetor pGEM-T Easy Vector. (B) curva padrão feita a partir dessas diluições.

Esse ensaio de PCR em tempo real para a detecção de LRV1-4 foi capaz de detectar moléculas de DNA até a diluição de  $10^{-10}$  do plasmídeo. Como a quantificação desse plasmídeo por espectrofotometria indicou que a quantidade inicial de DNA utilizada (plasmídeo não diluído) foi de  $1880 \mu\text{g/mL}$ , o limite de detecção da PCR em tempo real foi calculado em 22 moléculas.

Para a determinação da carga viral de LRV1-4 durante a curva de crescimento de *L. (V.) guyanensis* foi realizada uma curva de crescimento da cepa M4147 partindo de um inóculo de  $2 \times 10^5$  parasitas/mL em 30 mL de meio M199. A cada dia foram coletados  $1 \times 10^7$  parasitas, durante 8 dias. Também foi coletada uma alíquota de  $1 \times 10^7$  parasitas da cultura antes da curva de crescimento (“Controle LRV”) para utilizar como referência. As amostras

foram guardadas em TRIzol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Após as coletas dos 8 dias de crescimento, foi extraído o RNA total das amostras e, em seguida, as amostras foram quantificadas por espectrometria. A quantificação mostrou que a quantidade de RNA variava até 4 vezes de uma amostra para outra. Assim, foi decidido partir da mesma quantidade de RNA (500ng) de todas as amostras para realizar a transcrição reversa (RT). Três  $\mu\text{L}$  da RT foram utilizados para as reações de PCR em tempo real e todas as reações foram feitas em triplicatas (figura 9).

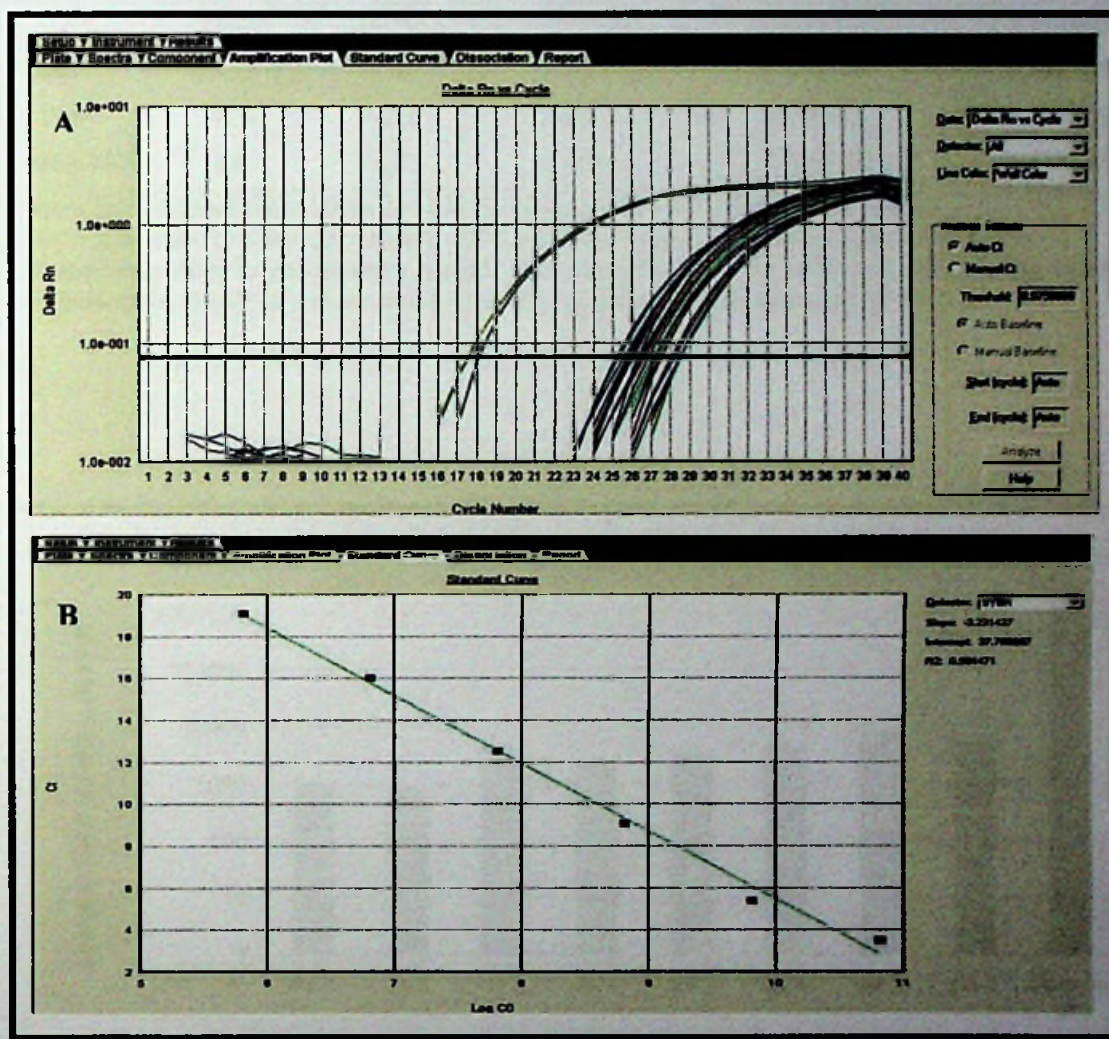


Figura 9: (A) curva de amplificação representativa da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 durante os 8 dias do crescimento de *L. (V.) guyanensis* em cultura. (B) curva padrão utilizando 6 diluições do plasmídeo pGEM-T Easy Vector com iniciadores LRV1-4 for/rev.

Tabela 5: Valores da carga viral média de LRV1-4 por PCR em tempo real.

Amostra	CT (LRV1-4)	CT (G6PD)	Quantificação de RNA de LRV1-4		
			Absoluta*	Relativa**	Absoluta normalizada***
Dia 1	28,24	18,90	9,07E+02	6,21E-04	1,10E+03
Dia 2	28,29	18,22	8,74E+02	3,73E-04	6,62E+02
Dia 3	27,23	17,48	1,85E+03	4,65E-04	8,25E+02
Dia 4	27,08	17,97	2,09E+03	7,22E-04	1,28E+03
Dia 5	26,42	18,16	3,29E+03	1,31E-03	2,32E+03
Dia 6	25,91	18,36	4,77E+03	2,13E-03	3,77E+03
Dia 7	25,28	19,00	7,43E+03	5,15E-03	9,14E+03
Dia 8	25,83	18,25	5,01E+03	2,09E-03	3,70E+03
Controle LRV	17,62	18,94	1,77E+06	1,00E+00	1,77E+06

\* quantificação absoluta feita a partir da utilização da curva padrão em cópias/500ng RNA.

\*\*quantificação relativa á amostra Controle LRV utilizando o gene G6PD como controle endógeno.

\*\*\*quantificação absoluta em cópias/500ng RNA normalizada pelo gene G6PD. Os valores dessa coluna foram obtidos pela multiplicação da coluna anterior pelo valor absoluto da amostra Controle LRV.

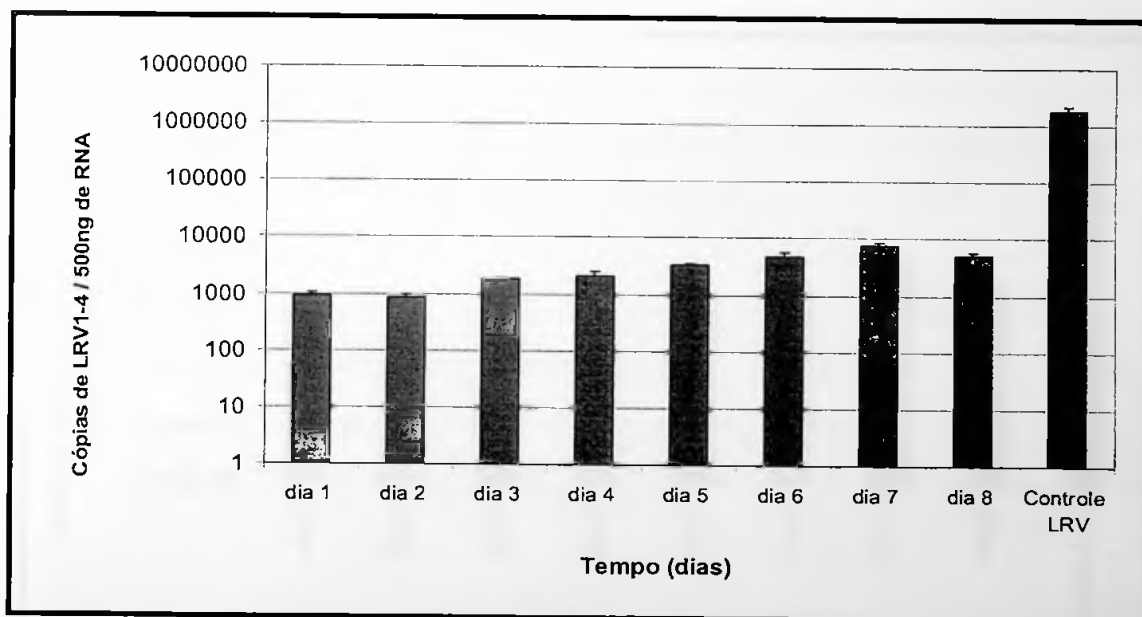


Figura 10: Quantificação absoluta em cópias/500ng de RNA do vírus LRV1-4. O "Controle LRV" é a alíquota de  $1 \times 10^7$  parasitas coletada antes do início da curva de crescimento.



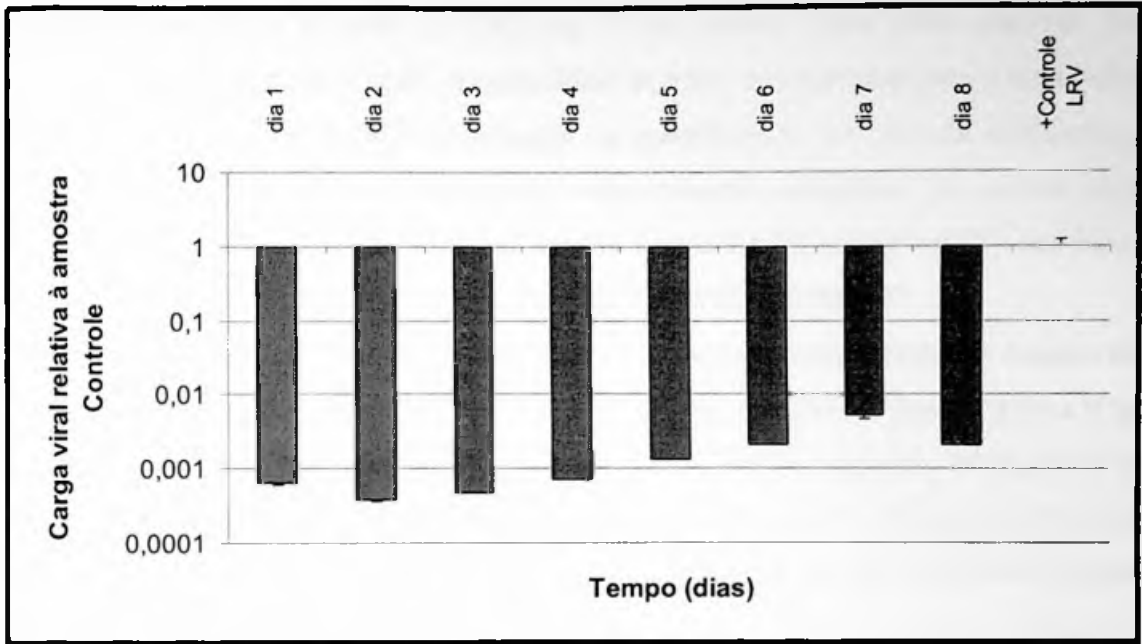


Figura 11: Quantificação relativa à amostra “Controle LRV” utilizando o gene G6PD de *Leishmania* como controle endógeno.

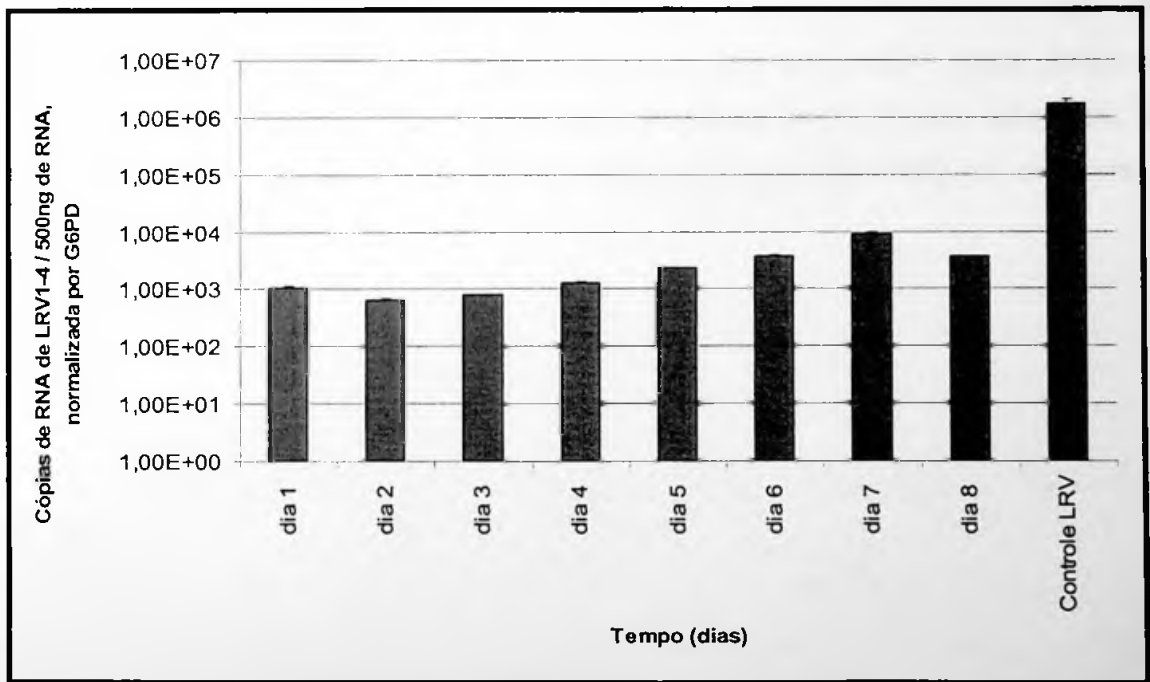


Figura 12: Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de *Leishmania*.

A quantificação absoluta sem normalização por um controle endógeno, apesar de ser um método muito utilizado, pode produzir resultados não confiáveis, pois o processo de contagem de parasitas e extração de RNA por TRIzol podem variar entre amostras. Dessa forma, foi utilizada a normalização da quantidade de RNA das amostras para a realização da transcrição reversa. Uma segunda abordagem de quantificação foi adotada utilizando-se a amplificação do gene G6PD de *Leishmania* como controle endógeno. Os valores obtidos nesta abordagem foram determinados em relação à amostra “Controle LRV”, que foi uma alíquota retirada da cultura antes da curva de crescimento da cepa M4147.

A quantificação relativa mostrou a carga viral foi menor em relação ao estoque de *L. (V.) guyanensis* de 2 a 3 ordens decimais de magnitude nos primeiros 8 dias de cultura (Figura 11). Resultado semelhante também foi visto na quantificação absoluta normalizada pelo controle endógeno G6PD (figura 12). É importante ressaltar que no primeiro dia foi notado que houve um decréscimo marcante (1000 vezes) do número de cópias de LRV em relação ao inóculo usado para originar as culturas.

### 4.3 Obtenção de um clone de M4147 sem o vírus LRV1-4

Uma cultura de M4147, submetida a múltiplas passagens por 1 ano e meio, foi utilizada em ensaio de plaqueamento de 300 células em meio semi-sólido. Foram obtidos 40 clones de M4147 que foram inoculados em meio de cultura M199. Dessas subculturas foi realizada a PCR convencional com iniciadores LRV1-4 *for/rev* e foi obtido um clone sem o vírus LRV1-4 (Figura 13).

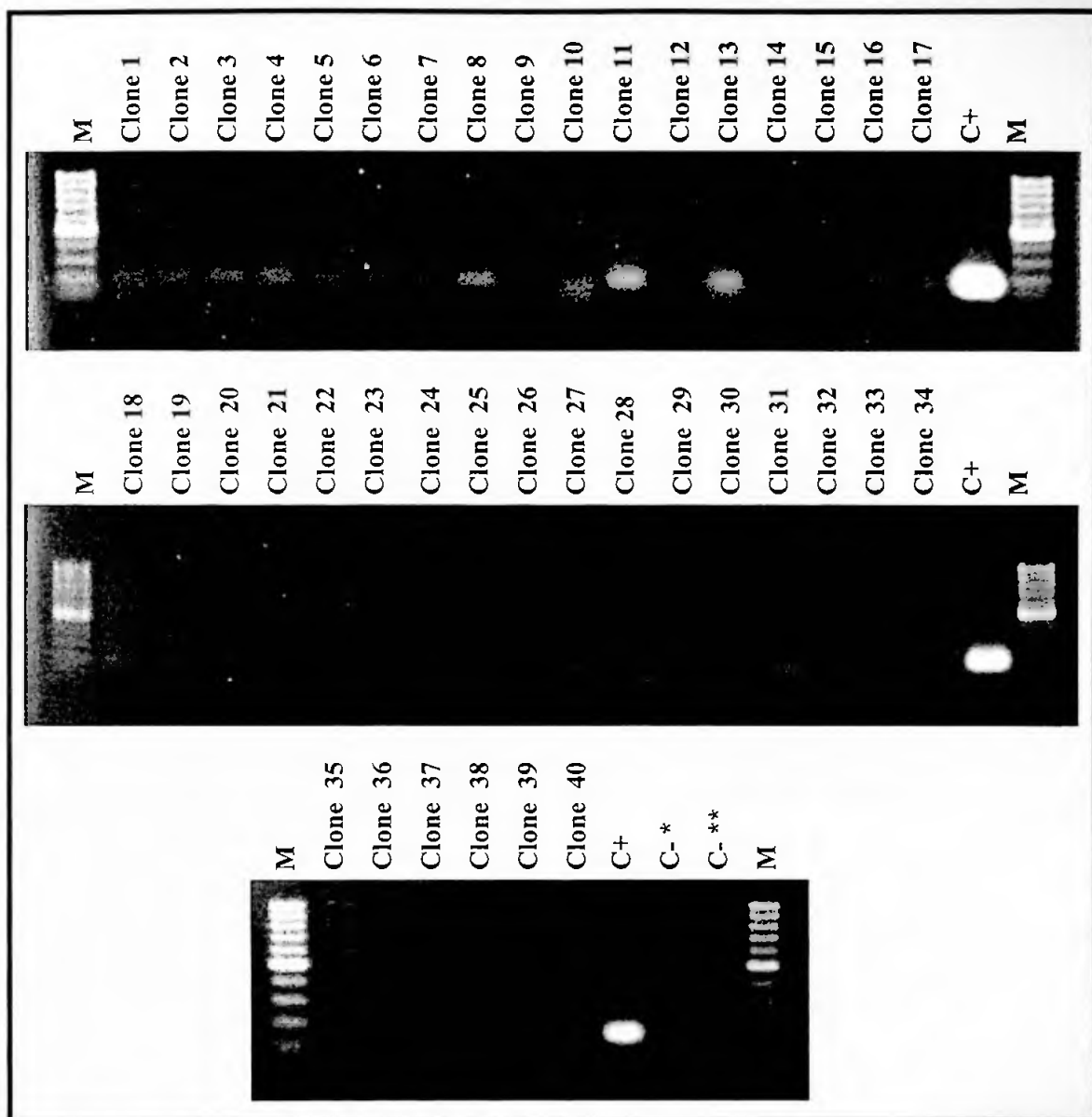
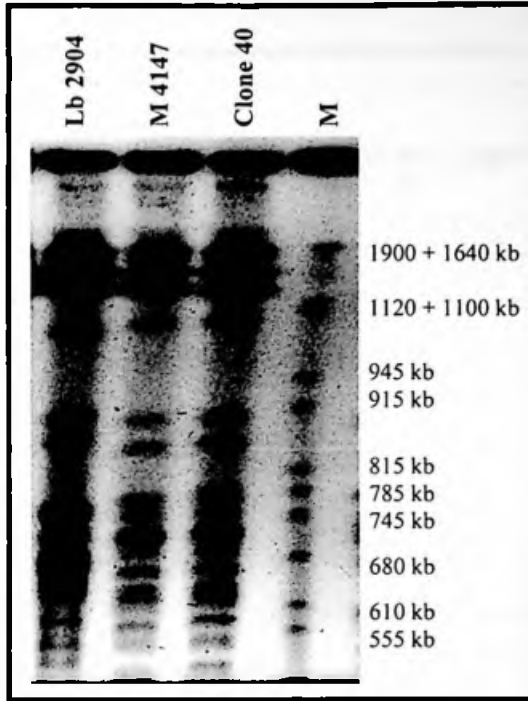


Figura 13: Produtos de PCR convencional para o vírus LRV1-4 com iniciadores LRV1-4 fow/rev nos clones obtidos por plaqueamento em meio semi-sólido. \*C- controle negativo da RT (H<sub>2</sub>O na RT); \*\*C- controle negativo do PCR (H<sub>2</sub>O no PCR). M: marcador de peso molecular 100pb (Fermentas Internacional Inc, Burlington, CA). Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Foi realizada a PCR em tempo real LRV1-4 no Clone 40 que confirmou a ausência do vírus LRV1-4.

Para confirmar que o clone 40 é de *L. (V.) guyanensis*, e não uma contaminação com outra cepa, foi determinado o cariótipo molecular por eletroforese em campo pulsátil do genoma de M4147 com o vírus LRV1-4 e do Clone 40.



**Figura 14:** Eletroforese em campo pulsátil (PFGE) mostrando o padrão de migração dos cromossomos de *Leishmania (V.) braziliensis* (Lb 2904), *Leishmania (V.) guyanensis* (M4147) e clone 40. M: Marcador de peso molecular Yeast Chromosome PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, MA, ENG). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (Imagem invertida).

Foi assim constatado que o clone 40 se trata realmente da *L. (V.) guyanensis* e esse clone foi utilizado para estudos comparativos da biologia do vírus.

#### 4.4 Crescimento de M4147 e Clone 40

Para avaliar do perfil de crescimento de promastigotas foram feitos inóculos de M4147 descongeladas recentemente (primeira passagem seriada – P1), M4147 na décima passagem (P10) e do clone 40.

Foi observado que o perfil de crescimento das promastigotas foi semelhante nas 3 culturas analisadas (figura 15).

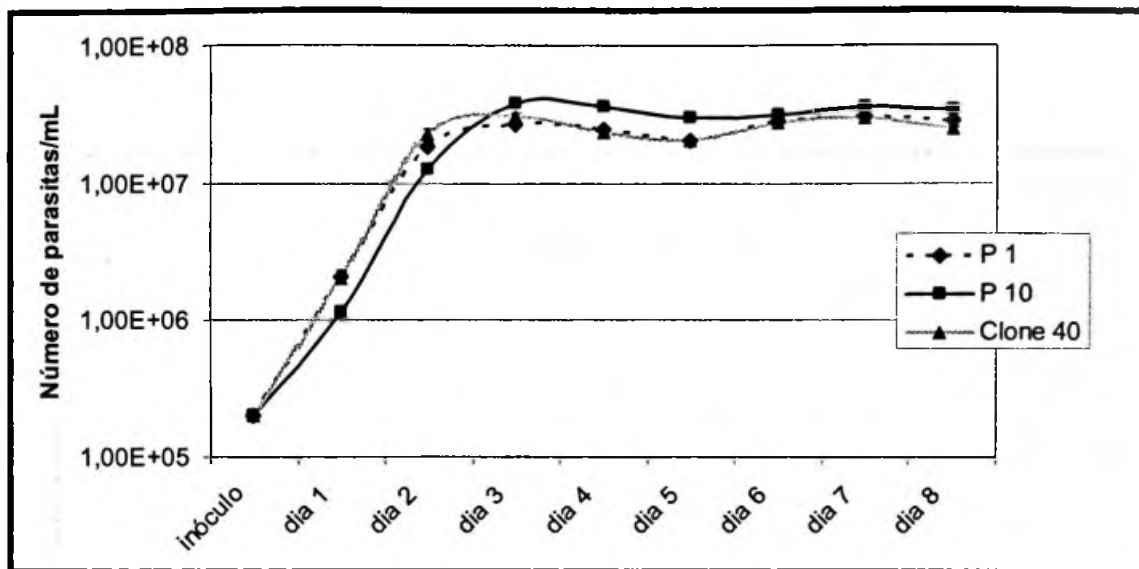


Figura 15: Curva de crescimento de três culturas de *L. (V.) guyanensis* M4147.

#### 4.5 Análise quantitativa do RNA de LRV 1-4 na linhagem M4147 e Clone 40 nas Passagens P1 e P10

Uma nova avaliação da carga viral foi feita por PCR em tempo real pelo método de SYBR Green (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) utilizando iniciadores específicos para a região 5'UTR do vírus LRV 1-4 nas passagens P1 e P10 de M4147 e no Clone 40.

Para a determinação da carga viral, foram coletados  $1 \times 10^7$  parasitas da cultura a ser utilizada para o pré-inóculo e no 3º dia da curva de crescimento das culturas. Foram utilizados 500 ng de RNA em todas as amostras para realizar a transcrição reversa (RT). Três microlitros da RT foram utilizados para as reações de real time PCR e todas as reações foram feitas em triplicatas (figura 16).

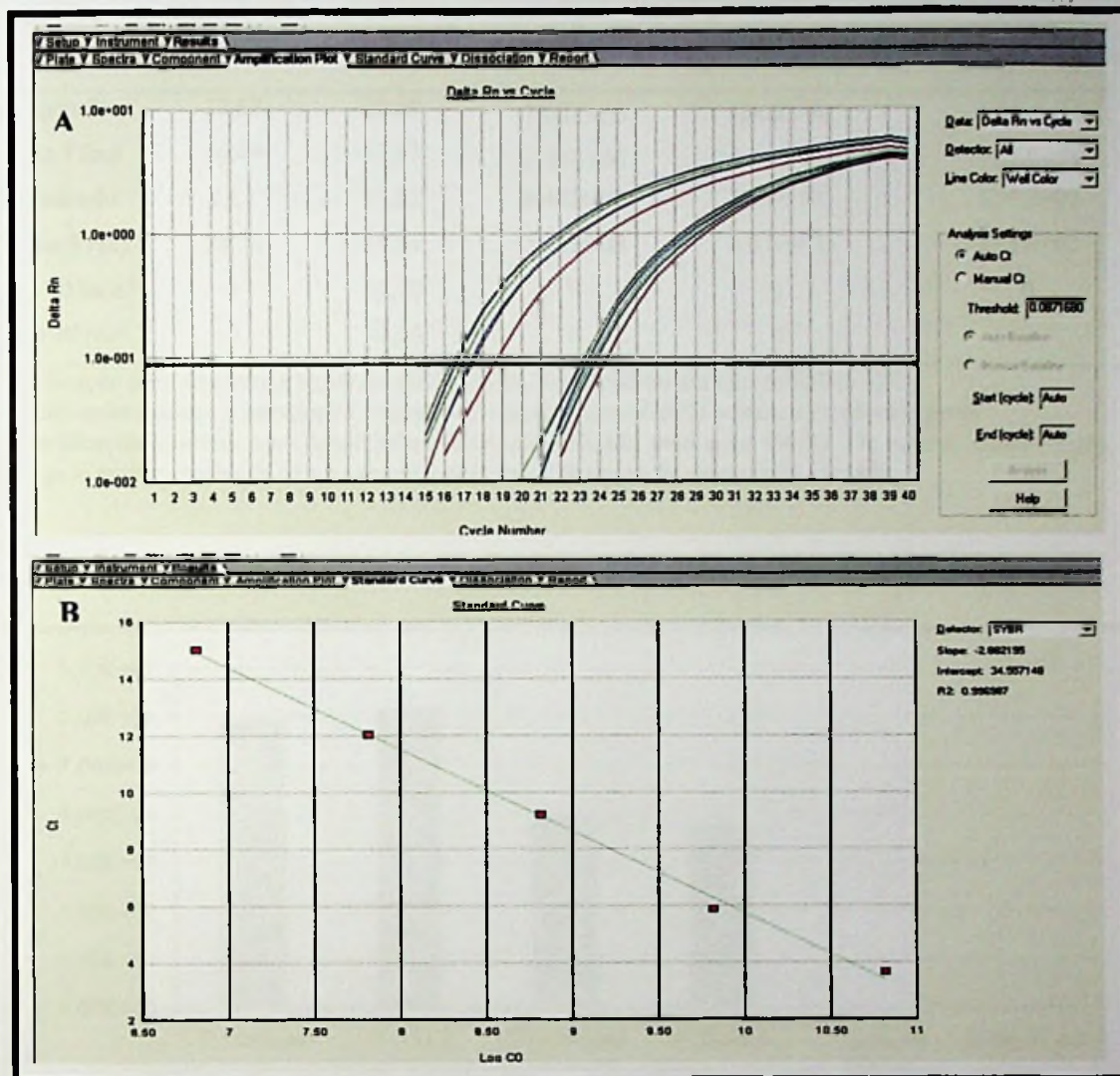


Figura 16: (A) curva de amplificação representativa da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 nas culturas em P1, P10 e do clone 40. (B) curva padrão utilizando 5 diluições do plasmídeo pGEM-T Easy Vector com iniciadores LRV1-4 fow/rev.

Tabela 6: Valores da carga viral média de LRV1-4 por PCR em tempo real em P1, P10 e Clone 40.

Amostra	CT (LRV1-4)	CT (G6PD)	Quantificação de RNA de LRV1-4		
			Absoluta*	Relativa**	Absoluta normalizada***
P1 inóculo	17,67	20,89	7,90E+05	1,00E+00	7,90E+05
P1 dia 3 (cc)	16,49	19,63	1,43E+06	9,48E-01	7,50E+05
P10 inóculo	23,1	21,02	9,48E+03	2,55E-02	8,70E+02
P10 dia 3 (cc)	23,76	19,04	5,71E+03	4,07E-03	2,61E+02
Clone 40 inóc.	0	19,20	0	0	0
Clone 40 (cc)	0	20,04	0	0	0

\* quantificação absoluta feita a partir da utilização da curva padrão em cópias/500ng RNA.

\*\*quantificação relativa à amostra P1 inóculo utilizando o gene G6PD como controle endógeno.

\*\*\*quantificação absoluta em cópias/500ng RNA normalizada pelo gene G6PD. Os valores dessa coluna foram obtidos pela multiplicação da coluna anterior pelo valor absoluto da amostra P1 inóculo.

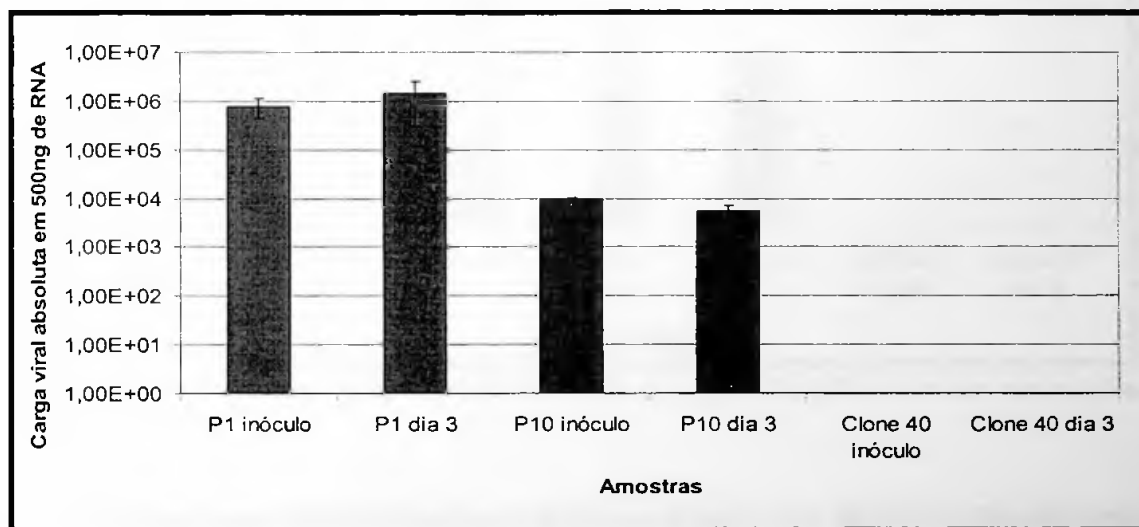


Figura 17: Quantificação absoluta em cópias/500ng de RNA do vírus LRV1-4 nas passagens P1, P10 e do Clone 40 de M4147.

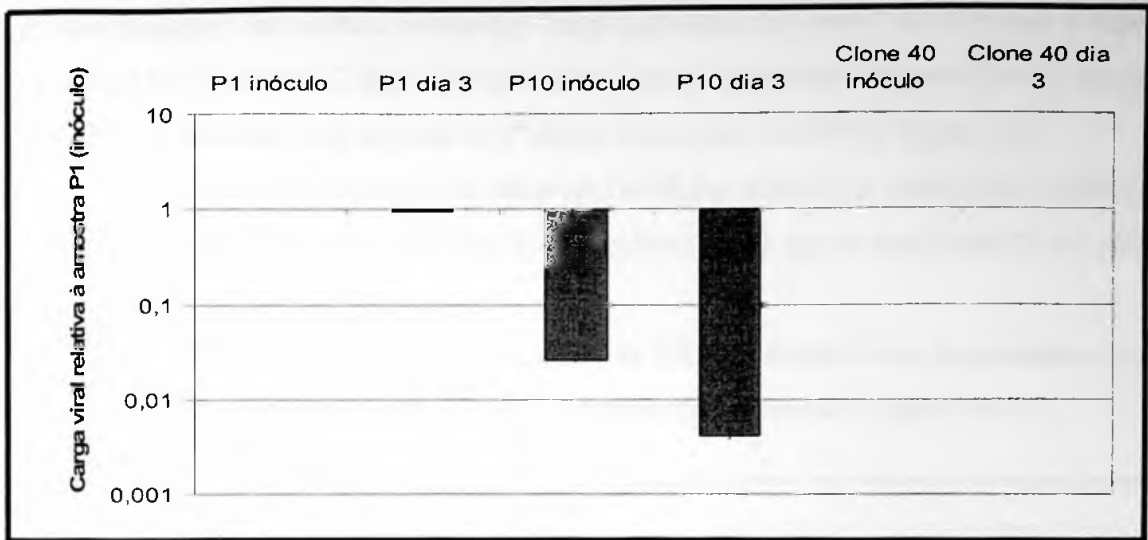


Figura 18: Quantificação relativa à amostra P1 inóculo utilizando o gene G6PD de *Leishmania* como controle endógeno.

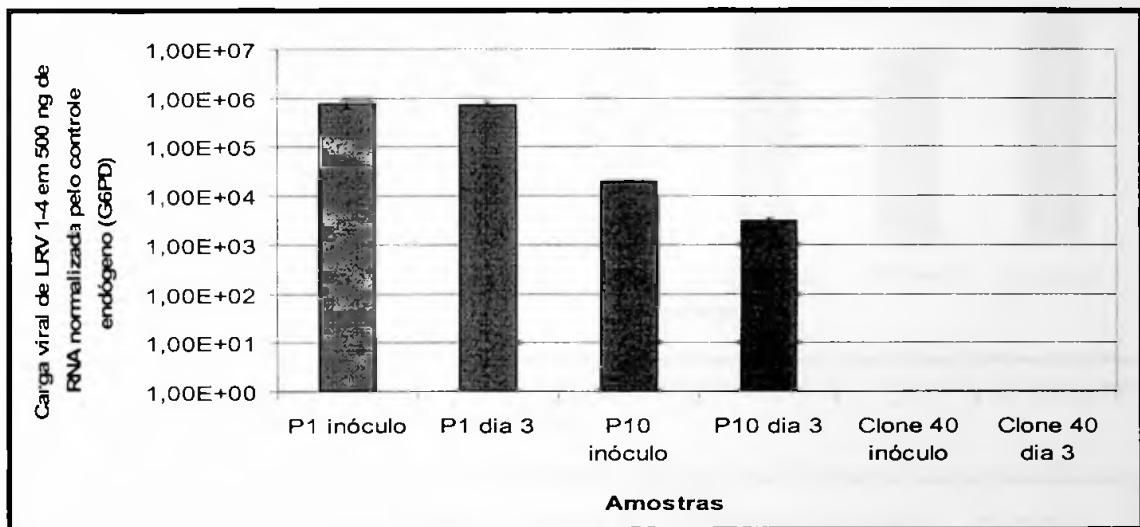


Figura 19: Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de *Leishmania* nas amostras P1, P10 e clone 40 de M4147.

Por meio desse experimento observamos que a carga viral de LRV1-4 na cepa M4147 diminui durante as passagens em cultura.

A quantificação relativa mostrou que a amostra P1 dia 3 apresentou carga viral semelhante à da amostra controle P1 inóculo, não havendo quase nenhuma diferença entre elas. Entretanto quando comparada à amostra P10 inóculo ou P10 dia 3 houve uma diferença de 1,5 log e 2,5 log, respectivamente (Figura 18). Assim observou-se que a cultura de M4147 na primeira passagem (P1) possui carga viral maior que a cultura na décima passagem (P10) e que quando P10 foi inoculada em nova curva de crescimento (P10 dia 3 – P11) a carga viral do LRV diminuiu cerca de um log. Este segundo experimento corrobora a análise quantitativa de LRV1-4 ao longo da curva de crescimento de *L. (V.) guyanensis* (Figuras 18 e 11). É provável que a diminuição da carga viral ao



longo das passagens em cultura ocorra por baixa replicação do vírus LRV1-4, pois a cepa de *Leishmania* M4147 aumenta 2 logs nos 3 primeiros dias de crescimento (Figuras 6 e 15), enquanto o vírus LRV1-4 aumenta 1 log somente no 7º dia de crescimento de M4147 (Figura 12).

O experimento foi repetido nas mesmas condições anteriores, após mais 4 passagens em cultura, coletando uma alíquota do dia 7. A cultura de P1 agora estava em P5 e a cultura de P10 estava em P15.

Foi novamente observado que a carga viral de LRV1-4 diminui com as passagens, porém havendo crescimento viral no sétimo dia do crescimento de *Leishmania* (figura 20 e 21).

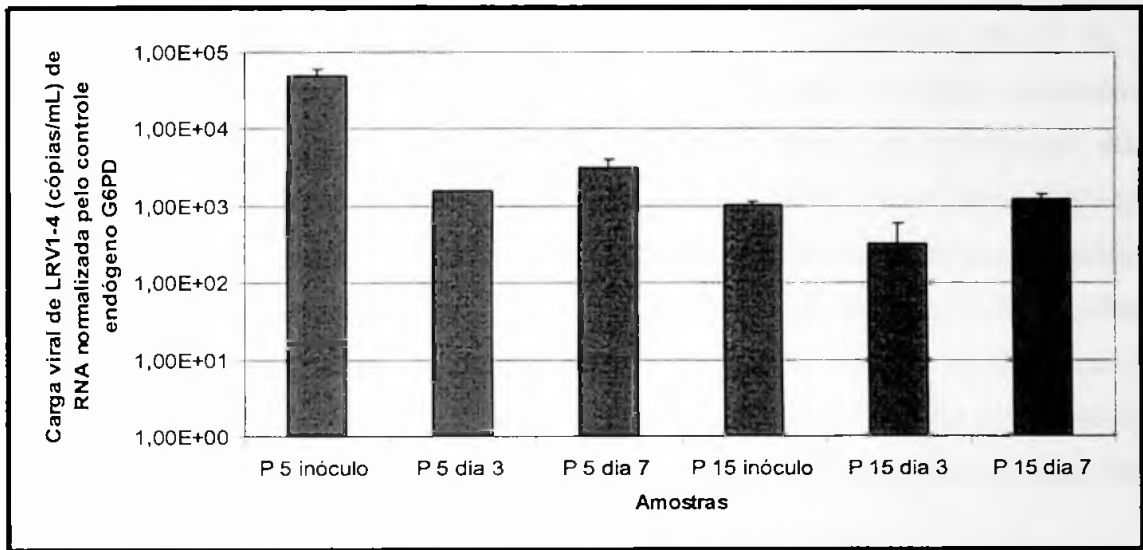


Figura 20: Quantificação absoluta de LRV1-4 normalizada pelo gene G6PD de *Leishmania* nas passagens P5 e P15 durante o 3º e 7º dia de crescimento de *Leishmania*.

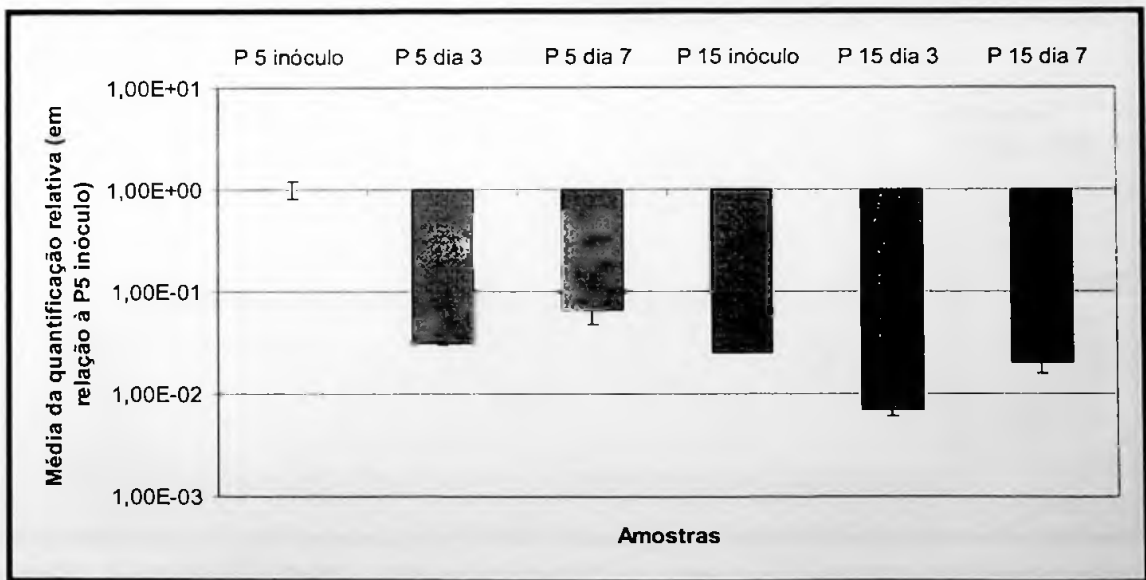


Figura 21: Quantificação relativa à amostra P5 inóculo durante o inóculo, 3º e 7º dia de crescimento da *Leishmania* M4147.

Assim, três experimentos independentes mostraram que a carga viral de LRV1-4 diminui ao longo das passagens da cultura de M4147. Mais interessante foi observar a carga viral do inóculo sempre superior à encontrada nos parasitos durante a fase exponencial de crescimento, o que nos permite concluir que a replicação viral ocorreu quando a *Leishmania* entrou em fase estacionária.

#### 4.6 O vírus LRV purificado infecta *Leishmania*?

Para verificar se o LRV somente é propagado por transmissão vertical ou se é capaz de infectar *Leishmania* horizontalmente, uma cultura de *L. (V.) guyanensis* M4147 na 3ª passagem foi centrifugada a  $2000 \times g$  por 10 minutos e o sedimento de células ressuspense em 5 mL de água destilada para o rompimento das células. A amostra foi centrifugada duas vezes a  $2000 \times g$  por 10 minutos e o sobrenadante foi passado em filtro de  $0,22\mu\text{m}$ . O filtrado foi misturado a 5mL de meio de cultura M199 2X [concentração final 1X]. Este sobrenadante foi utilizado para ressuspender o sedimento de células do Clone 40 (sem LRV1-4). A cultura foi mantida em estufa a  $26^\circ\text{C}$  por 4 semanas. Aliquotas do sobrenadante e do sedimento de células foram coletadas semanalmente (total de 4) e guardadas em TRIzol para posterior extração de RNA total e RT-PCR em tempo real pelo método de SYBR Green (Figura 22 e Tabela 7).

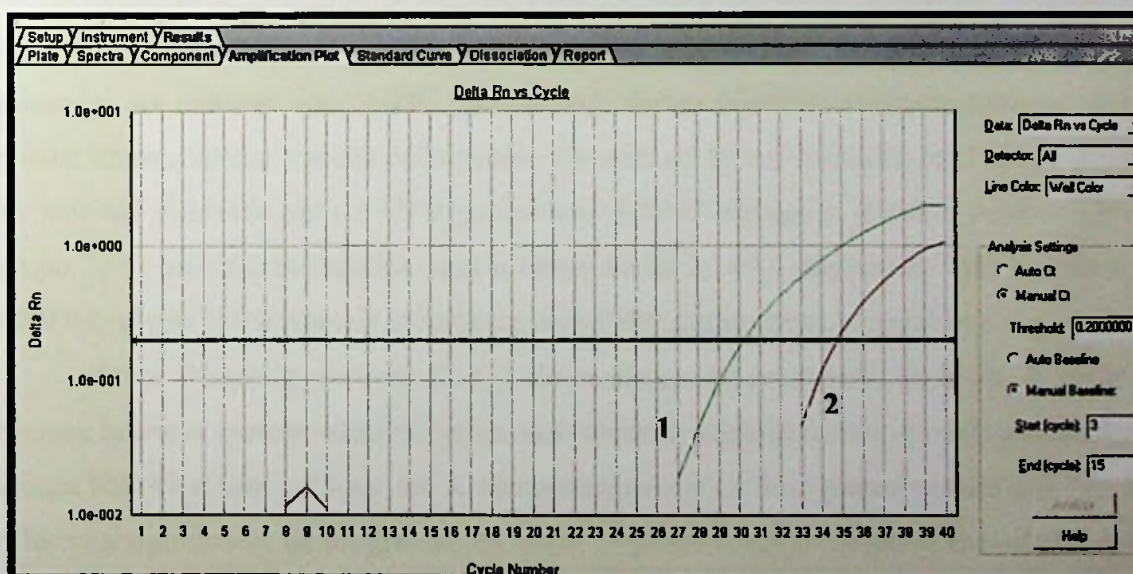


Figura 22: Curva de amplificação representativa da PCR em tempo real para o vírus LRV1-4 na cultura do clone 40. (1) Amostra do filtrado do inóculo. (2) Sobrenadante da primeira coleta.

**Tabela 7:** Amplificação de LRV1-4 por PCR em tempo real do inóculo de LRV (controle +) usada para infectar o Clone 40. (X) indica amostras que amplificaram.

Semanas	Coletas	
	Sobrenadante	Células
0 – filtrado do inóculo	X*	
1ª semana	X**	-
2ª semana	-	-
3ª semana	-	-
4ª semana	-	-

\* Amostra número (1) na PCR em tempo real.

\*\* Amostra número (2) na PCR em tempo real.

Foi observada amplificação somente na amostra do sobrenadante da primeira coleta (2) e do controle positivo filtrado do inóculo (1). Assim pode-se concluir que o vírus LRV é incapaz de infectar, em cultura axênica, o parasita *Leishmania*.

## 4.7 Infecção experimental *in vitro* e *in vivo*

### 4.7.1 Infecção em pata de hamster

Para investigar se a infecção pelo vírus LRV1-4 altera de algum fenótipo na infectividade da *L. (V.) guyanensis*, hamsters (*M. auratus*) foram infectados com M4147 na segunda passagem (P2) e com o clone 40, e o progresso da lesão foi acompanhado durante 10 semanas. As culturas com  $2 \times 10^8$  parasitas/mL foram injetadas subcutaneamente na região plantar da pata direita traseira de hamsters. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo 1, 11 animais infectado com *L. (V.) guyanensis* M4147 selvagem (contem o vírus LRV1-4); grupo 2, 11 animais inoculados com o clone 40 de *L. (V.) guyanensis* M4147 sem o vírus LRV1-4; grupo 3, e 5 animais inoculados com PBS (grupo controle negativo).

Até a 4ª semana de infecção foi observada pouca progressão da lesão. A partir da 5ª semana houve o aparecimento de lesões visivelmente acentuadas nos animais inoculados com a cepa M4147 e com o Clone 40. A comparação entre os dois grupos mostra que não houve diferença significativa na progressão da lesão. O grupo controle negativo inoculados somente com PBS permaneceu inalterado (Figura 23).

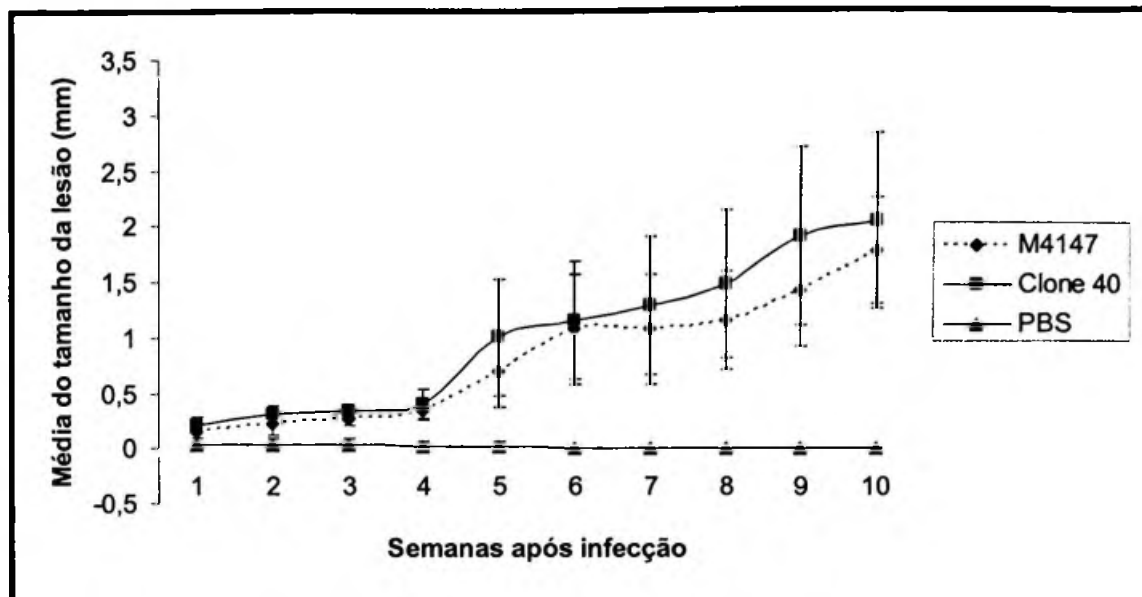


Figura 23: Progresso da lesão em hamsters infectados com *L. (V.) guyanensis*. Parasitas em fase estacionária ( $1 \times 10^7$  células/inóculo) foram injetados por via subcutânea nas patas direitas posteriores de *M. auratus*. O desenvolvimento da lesão foi monitorado por medidas da espessura da pata com um paquímetro. Cada ponto representa a média (N=11) do tamanho da lesão (+/- erro padrão).

#### 4.7.2 Infecção em cultura de células

Cultura de macrófagos peritoneais de BALB/c foram incubadas com as cepas M4147 na segunda passagem (P2) ou com o clone 40 para análise de diferenças na infecção e proliferação de *Leishmania*. Culturas em fase estacionária tardia (3 dias após o final da fase exponencial) foram coletadas e incubadas na proporção de 10 *Leishmanias* para cada macrófago. As culturas inoculadas com *Leishmania* e macrófagos foram colocadas sobre lamínulas em placas de 24 poços. Foram feitas coletas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. As lamínulas foram coradas pelo kit comercial de coloração Panótico Rápido LB e montadas em lâminas sobre uma gota de Permout (Fischer Scientific). A porcentagem foi determinada (Figura 24) por análise de 3 campos diferentes fotografados de cada lâmina.

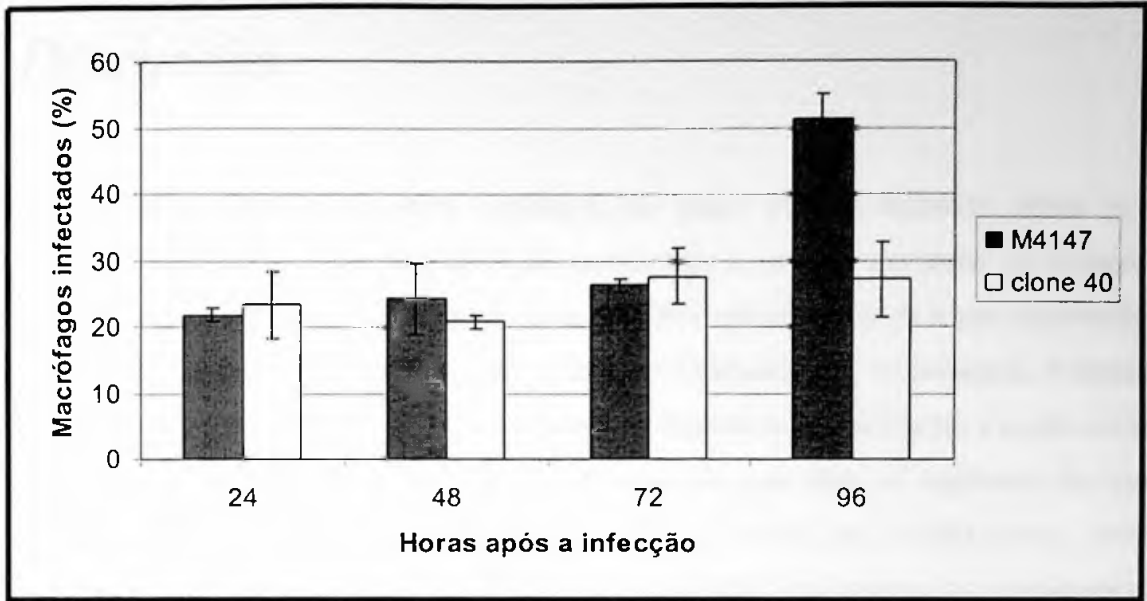


Figura 24: Porcentagens de macrófagos infectados com as culturas de *Leishmania* M4147 e do clone 40.

As duas culturas de macrófagos apresentaram taxa de infecção muito parecida (~25%) até as 72 horas pós-infecção. A partir de 96 horas, a cultura inoculada com M4147 mostrou uma maior taxa de infectividade (51%). Este resultado mostra uma possível tendência do vírus atuar sobre a infectividade do parasita.

Também foi determinada a carga de parasitas nas culturas contando o número de amastigotas presentes nos macrófagos infectados. Para isso foram contados 50 macrófagos infectados e o número de amastigotas presentes no citoplasma foi determinada (Figura 25).

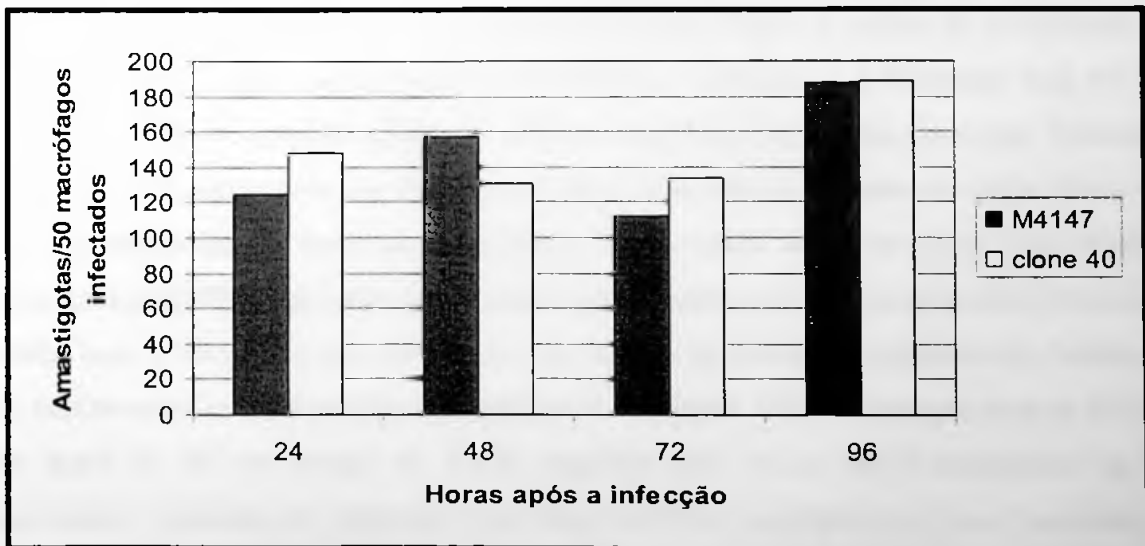


Figura 25: Número de amastigotas presentes em 50 macrófagos infectados.

A contagem do número de amastigotas mostrou que as duas culturas apresentaram quantidades muito parecidas de parasitas infectantes.

## 5 Discussão

A leishmaniose é um grave problema de saúde pública mundial, tendo como agravantes o alto custo e complexidade do tratamento, a recente expansão do número e tamanho de áreas endêmicas, sobreposição com a AIDS e outras causas de imunossupressão.

A existência de vírus de RNA que parasitam *Leishmania* spp. é conhecida. Entretanto além de saber-se pouco acerca da sua importância biológica, o conhecimento é muito restrito quanto ao ciclo replicativo desses agentes. Assume-se que eles se replicam de modo semelhante ao vírus de *Saccharomyces cerevisiae* L-A (LI) (ScV-L-A) (WEEKS et al.; 1992).

Neste estudo foi avaliada a replicação do vírus LRV1-4 ao longo do crescimento de *Leishmania (V.) guyanensis*, por PCR em tempo real. A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica muito sensível que permite a detecção dos produtos da PCR em cada ciclo da fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um único ensaio. Os resultados obtidos com este método mostraram que, em passagens em cultura axênica, houve uma diminuição de vírus LRV1-4 em culturas de *Leishmania (V.) guyanensis* M4147. Uma cultura de M4147 mantida em passagens seriadas por um ano e meio, permitiu isolar um clone (Clone 40) não infectado pelo vírus, o que possibilitou estudos de comparação com a cepa parental M4147 para avaliação de provável importância do vírus LRV na geração de alterações fenotípicas de *Leishmania (V.) guyanensis*.

A análise da replicação viral de LRV1-4 ao longo da curva de crescimento de *Leishmania (V.) guyanensis* M4147 mostrou que, enquanto a *Leishmania* está na fase exponencial de crescimento (até o 3º dia) há uma baixa replicação do vírus. Entretanto, quando a *Leishmania* entra em fase estacionária é observado o aumento da carga viral e com pico no sétimo dia da curva de crescimento. Esses dados estão de acordo com Weeks e colaboradores (1992) que estudaram a localização celular do LRV. Por meio de *Northern blot* sondas para o LRV1-1 foram hibridadas com frações de núcleo e citoplasma de *Leishmania* em fase de crescimento exponencial e em fase estacionária. Foi relatado que vírus de RNA de fita dupla só foi encontrado na fração citoplasmática, e em maior quantidade na fase estacionária. Também foi observada a presença de RNA fita simples em maior quantidade na fase estacionária. RNA fita simples encontrado no citoplasma é tido como uma evidência de replicação desse vírus (WEEKS et al.; 1992).

Neste estudo foi demonstrado que a carga viral se reduz ao longo de passagens em meio de cultura. Este fato pôde ser evidenciado em análises da carga viral relativa quando

comparada as passagens P1 e P10 e P5 e P15. Essa redução da carga viral ao longo das passagens se deve provavelmente à baixa replicação do LRV1-4, pois a cepa de *Leishmania* M4147 aumenta 2 logs nos 3 primeiros dias de crescimento, enquanto que o vírus LRV1-4 atinge um aumento de 1 log somente no 7º dia. É possível que a distribuição do vírus não seja equânime entre células filhas. Assim, durante a fase exponencial a quantidade de vírus por parasita caiu bastante abaixo de 1. Já na fase estacionária, quando o parasita não mais se dividia, observou-se recuperação no número de cópias de vírus por parasito, todavia nunca retornando a níveis originalmente observados antes do experimento. De todo modo, fica claro que LRV1-4 é um vírus de replicação mais lenta do que a velocidade de divisão do seu hospedeiro.

A baixa replicação viral de LRV pode ser seja um mecanismo regulatório do próprio vírus para manter-se uma infecção persistente. Chung e colaboradores (1994) identificaram pequenos fragmentos de RNA viral em célula infectadas por LRV, mais tarde identificaram como segmentos gerados por clivagem do RNA viral (MacBETH; PATTERSON, 1995). Em 2000, Ro e Patterson identificaram o sítio da clivagem do RNA mensageiro (+) e mostrou-se que ocorria na região 5' UTR no nucleotídeo 320 (GAUC\*CGAA). Paralelamente, Widmer (1995) observou que quando a proteína do capsídeo viral era superexpressa havia a supressão da replicação do RNA viral. Estudos posteriores mostraram que a clivagem do RNA viral é realizada pela atividade de endoribonuclease da proteína do capsídeo (MacBETH; PATTERSON, 1998). Esta ação leva a um controle da carga viral dentro do parasita.

Provavelmente em consequência desses mecanismos foi possível obter um clone de M4147 que "perdeu" o vírus durante passagens no laboratório o que permitiu avaliar diferenças fenotípicas possivelmente dependentes do vírus.

O RNA de interferência é um sistema altamente específico de silenciamento gênico pós-transcricional desencadeado pela produção de moléculas de dsRNA endógenas ou exógenas de (MILHAVET, 2003). É um mecanismo evolucionariamente conservado para o silenciamento da expressão gênica e proteção contra vírus e outros elementos genéticos como os retrotransposons. Peacock e colaboradores (2007) já mostraram que o parasita *L. (V.) braziliensis* possui genes da maquinaria de RNAi. A cepa de *L. (V.) guyanensis* também possui tais genes e esses são expressos como observamos realizando RT-PCR para os genes da RNase III (Dicer-like) e da endonuclease Argonauta (dados não mostrados). Interessante ressaltar que mesmo possuindo a maquinaria de RNAi expressa, o vírus LRV, que é de RNA fita dupla, não é degradado. Tal poderia decorrer do fato do dsRNA nunca ser encontrado livre no citoplasma celular e assim não ser reconhecido pela Dicer.

Embora muitos vírus dsRNA tenham sido descobertos em muitos protozoários (WANG; WANG, 1991), a influência desses vírus sobre os hospedeiros parasitas e a contribuição da infecção viral na patogenicidade ainda são pouco conhecidas. Um bom exemplo da relação de vírus/hospedeiro é a do vírus de RNA *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) que infecta o ascomiceto *Cryphonectria parasitica*, um fungo de planta, e é conhecido por diminuir a virulência e esporulação desse agente patogênico de plantas (KAZMIERCZAK et al.; 1996).

Ainda não foi evidenciada nenhuma alteração fenotípica de *Leishmania* devida à presença do vírus LRV. Não é conhecido se o vírus pode atuar no aumento/diminuição de patogenicidade ou infectividade de *Leishmania*.

Ao longo deste trabalho alguns métodos experimentais de infecção, *in vivo* e *in vitro*, permitiram comparar M4147 infectada com o vírus LRV1-4 com o clone 40 de M4147, que perdeu o vírus ao longo das passagens em cultura. Inicialmente, verificamos que as curvas de crescimento e as quantidades de parasitas nas culturas de M4147 e do Clone 40 se mostraram semelhantes, tanto na fase exponencial, quanto na fase estacionária.

Vimos que o LRV1-4 não foi capaz de infectar uma cultura axênica de *L. (V.) guyanensis* da cepa M4147, mas que perdera o vírus (Clone 40). Assim, é possível afirmar que esse vírus não apresenta transmissão horizontal em cultura axênica de *L. (V.) guyanensis*. A transmissão vertical de LRV1-4 em *L. (V.) guyanensis* M4147 necessariamente foi iniciada pela aquisição do vírus por esta cepa do parasita - ou um parasita ancestral. Uma possibilidade a ser testada no futuro é se tal infecção horizontal de *L. (V.) guyanensis* por LRV1-4 ocorreu no flebotomíneo, por requerer algum fator próprio do inseto.

A determinação da porcentagem de macrófagos infectados por M4147 e pelo Clone 40 mostrou que as duas culturas se comportaram da mesma maneira até 72 horas (22-28% de macrófagos infectados pós-infecção). Porém, às 96 horas houve aumento significativo do número de macrófagos infectados pela cultura inoculada com *L. (V.) guyanensis* M4147 (51% de macrófagos infectados), enquanto que a cultura infectada com o Clone 40 se manteve constante. Em relação à carga parasitária, ou seja número de amastigotas por célula infectada, não foram observadas diferenças significativa entre as duas culturas. Há aqui uma evidência indireta de que, ao menos *in vitro*, a presença de LRV1-4 aumenta a infectividade de *L. (V.) guyanensis* em macrófagos peritoniais murinos. Esse resultado case se confirme em culturas de macrófagos de outras origens (medula óssea, por exemplo), torna-se um ponto de partida interessante para investigações mecanísticas de como LRV1-4 estaria alterando essa infectividade.



A infecção *in vivo* em pata de hamsters permitiu observar que M4147 e o Clone 40 causaram lesões de padrão muito semelhante. A visível progressão da lesão deu-se a partir da 5ª semana, com aumento médio do tamanho da lesão de aproximadamente 2mm. Vale ressaltar que o desvio padrão dos tamanhos das lesões causadas por ambas as culturas de *L. (V.) guyanensis*, foram elevados, mostrando assim alto grau de variação de um animal para o outro (Anexo 1).

É muito provável que algum benefício evolutivo resulte do parasitismo de *Leishmania* por vírus que aparentemente não causam no protozoário nenhum efeito deletério, mas cuja transmissão vertical permite a propagação dos genes virais. No entanto, quase nada se sabe sobre esses vírus, apesar da grande relevância que parasitas do gênero *Leishmania* têm em saúde pública. O presente estudo mostrou que um dos possíveis vírus de *Leishmania*, o LRV1-4, que se propaga verticalmente em *L. (V.) guyanensis*, não teve efeito significativo sobre fenótipos de crescimento deste protozoário em cultura axênica. No entanto, a tendência observada de maior infectividade *in vitro* de *Leishmania* contendo LRV1-4, para macrófagos peritoneais murinos, do que do mesmo protozoário sem o vírus, indica que a presença do vírus pode ter efeito favorável à infectividade do parasita para o hospedeiro vertebrado. Estudos adicionais serão necessários para aprofundar conhecimento sobre a relação parasita-hospedeiro de LRV1-4 e *L. (V.) guyanensis* em modelos de infecção *in vivo*.

## 6 Conclusões

1. O vírus LRV1-4 apresenta pouca ou nenhuma replicação na fase exponencial de crescimento de *L. (V.) guyanensis*.
2. A replicação viral ocorre quando a *Leishmania* está na fase estacionária.
3. Há diminuição da carga viral de LRV 1-4 durante passagens de *L. (V.) guyanensis* em cultura axênica.
4. Não há efeito do vírus sobre o crescimento de *L. (V.) guyanensis* em cultura axênica.
5. A presença de LRV1-4 aumentou a infectividade de *L. (V.) guyanensis* para macrófagos peritoneais murinos *in vitro*.
6. A presença do vírus não alterou a quantidade de amastigotas nos macrófagos infectados.

## 7 Referências Bibliográficas

ASHFORD, R. W.; et al. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*. v. 8 p. 104 – 105, 1992.

ARMSTRONG, T. C.; et al. Successful transient introduction of *Leishmania* RNA virus into a virally infected and an uninfected strain of *Leishmania*. *Proc Natl. Acad. Sci.* p. 1736 – 1740. 1993.

BALANCO, J.M.F.; et al. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. *Parasitol*, v. 116, p. 103-113, 1998.

BIRNBOIM, H.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, v. 7, n. 6, p. 1513-23, 1979.

BRUENN, J. A. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research*, v. 21, n. 24 p. 5667-69, 1993.

CADD, T. L.; et al. Detection of *Leishmania* RNA virus 1 Proteins. *J. Virology* v. 67, p. 5647-5650, 1993.

CADD, T. L.; PATTERSON, J. L. Synthesis of viruslike particles by expression of the putative capsid protein of *Leishmania* RNA virus in a recombinant baculovirus expression system. *J. Virology*. v. 68, p. 358-365, 1994.

CHUNG, I. K.; et al. Identification of a short viral transcript in *Leishmania* RNA virus-infected cells. *Virology*. v. 198, p. 552 – 556, 1994,

CONTIJO, C. M. F. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Res. Bras. Epidemiol.* v. 7 n. 3, p. 338 – 349, 2004.

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Acesso em 09.11.2009

GIANNINI, S. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*, v. 232, n. 4751, p. 762-5, 1986).

GRIMALDI, G. JR; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *American Society for Microbiology*, p. 230 – 250, 1993.

GUPTA, V.; DEEP, A. An insight into the *Leishmania* RNA virus. *Indian Journal of Medical Microbiology*. v. 25, n.1, p. 7 – 9, 2007.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M. et al. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30 kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol*, v. 10, n. 3, p. 1084-94, 1990.

MACBETH, K. J.; PATTERSON, J. L. The short transcript of *Leishmania* RNA virus is generated by RNA cleavage. *Journal of Virology*. v. 69 n.6, p. 3458 – 3464, 1995

MILHAVET, O.; et al. RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev*, v. 55, n. 4, p.629-648. 2003.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2007. site: [www.opas.org.br/prevencao](http://www.opas.org.br/prevencao) acesso em: 12/05/2007

PESSÔA, S.; MARTINS, A. M. *Parasitologia Médica*. 11 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1982, 872 pp.

Parasitology Research and Encyclopedia Reference of Parasitology – <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/> Acesso em 08.11.2009.

PEACOCK, C. S.; et al. Comparative genomic analyses of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, v. 39, n. 7, p. 839-847. 2007.

RO, Y.; PATTERSON, J. L.; Identification of the minimal essential RNA sequences responsible for site-specific targeting of the *Leishmania* RNA virus 1-4 capsid endoribonuclease. *Journal of Virology*, v. 74, n. 1, p. 130-38, 2000.

SAIZ, M.; et al. Short report: detection of Leishmanivirus in human biopsy samples of Leishmaniasis from Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* p. 192 – 194, 1998.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, I.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. [S.I.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SCHEFFTER, S.; et al. Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. *Virology*. p. 479 – 483, 1994.

SCHEFFTER, S. M.; et al. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV 2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*. v.212, p. 84 – 90, 1995

SCHWARTZ, D.; CANTOR, C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, v.37, n. 1, p. 67-75, 1984.

STUART, K. D.; et al. Molecular organization of the *Leishmania* RNA virus LRV1. *Biochemistry*, p. 8596 – 8600, 1992.

TARR, P. I. et al. LR1: A candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, p. 9572 – 9575, 1988.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T.; RNA interference in protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 6, p. 509-519. 2004.

WANG, A.; WANG, C. C. Discovery of a specific double-strand RNA virus in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 21, p. 269-276, 1986a

WANG, A.; WANG, C. C. The double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis* may originate from virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 83, p. 7956-60, 1986b

WICKNER, R. B. , Viruses of Yeasts, Fungi, and Parasitic Microorganisms, in *Fields Virology*, HOWLEY, P. M.; KNIPE, D. M., Editor. Philadelphia. P. 629 – 639, 2001

WIDMER, G.; et al. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 86, p. 5979 – 5982, 1989

WIDMER, G.; DOOLEY, S. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. *Nucleic Acids Research.* v. 23 n.12, p. 2300 – 2304, 1995.

WEEKS, R. et al; LRV1 viral particles in *Leishmania guyanensis* contain double-stranded or single-stranded RNA. *Journal of Virology*, v. 66, n. 3, p. 1389-93, 1992.

ZAMORA, M.; et al. Phylogenetic analysis of the 5' subterminal region of isolates of *Leishmania* RNA virus-1. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* v. 94, n.2 p. 123-133, 2000.

ZHOU, M.; CLARK, S.; GOMEZ-SANCHEZ, C. Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques*, v. 19, n.1, p. 34-5, 1995).

# Anexo

Anexo 1: Valores da diferença da medida das patas de hamster (pata infectada – pata não infectada) em mm durante as 10 semanas pós-infecção.

Animais	Semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G1	0,2	0,3	0,3	0,5	0,8	1	1	1,3	1,4	1,8
	0,1	0	0,2	0,3	0,7	0,9	1	1,1	1,4	1,7
	0,2	0,3	0,3	0,3	0,7	0,8	0,7	0,8	1	1,7
G2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,7	1,2	0,9	0,9	1,1	1,7
	0,2	0,3	0,3	0,3	0,6	1	0,9	0,9	1	1,6
	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,7	0,8	0,8	1	1,2
G3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	1,1	1,3	1,2	1,8	2,2
	0,1	0,2	0,2	0,3	0,5	0,9	1	1,1	1,6	1,6
	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,7	0,8	1	1,6	1,5
G4	0,1	0,2	0,3	0,5	1,6	2,5	2,5	2,4	2,7	3
	0,1	0,2	0,2	0,3	0,7	1,1	1	1,2	1,1	1,6
<b>média</b>	0,15454545	0,22727	0,27273	0,34545	0,7	1,08182	1,08182	1,15455	1,42727	1,78182
<b>des. Pad</b>	0,06875517	0,11037	0,06467	0,09342	0,32863	0,49763	0,49562	0,44579	0,50812	0,46865
Clone 40	0,2	0,4	0,4	0,5	1,6	2,5	2,7	3,3	3,7	4,2
	0,3	0,3	0,3	0,3	0,7	1	1,1	1,3	2,6	2,2
	0,2	0,2	0,3	0,2	0,6	0,9	0,9	1	2,5	2
G2	0,3	0,4	0,4	0,7	2,2	2	2,4	2,2	2,7	2,8
	0,3	0,3	0,4	0,5	1,6	1	1,2	1,3	1,7	1,8
G2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,7	0,8	0,9	1,2	1,4	1,7
	0,2	0,2	0,3	0,3	0,7	0,8	0,9	1,2	1,4	1,7

Animais	Semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G3	0,2	0,4	0,4	0,5	1,1	1	1	1,4	1,4	1,7
	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,3	1,6
	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9	1,2
G4	0,1	0,4	0,4	0,4	1	1,1	1,5	1,6	1,8	2
	0,2	0,3	0,3	0,4	0,8	1	1	1,3	1,7	1,9
<b>média</b>	0,22727273	0,31818	0,34545	0,41818	1,03636	1,17273	1,31818	1,50909	1,97273	2,1
<b>des. pad</b>	0,06466698	0,07508	0,05222	0,1328	0,54272	0,55334	0,64003	0,69203	0,81375	0,8025
PBS	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0
<b>média</b>	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0	0	0	0	0
<b>des. pad</b>	0,05477226	0,05477	0,05477	0,04472	0,04472	0	0	0	0	0