

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

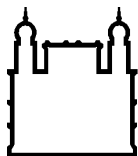
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular – IOC**

**IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS  
RHABDOVIRAIS ENDÓGENOS (EREs) EM  
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS E ADULTOS DE  
*Lutzomyia longipalpis* E OUTROS  
FLEBOTOMÍNEOS**

**Monique de Souza Zezza Ramalho**

**Orientadora:** Prof. Dra. Yara Maria Traub Csekö

Rio de Janeiro  
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

# IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS RHABDOVIRAIS ENDÓGENOS (EREs) EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS E ADULTOS DE *Lutzomyia longipalpis* E OUTROS FLEBOTOMÍNEOS

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Yara Maria Traub Csekö

RIO DE JANEIRO

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

de Souza Zezza Ramalho, Monique.

IDENTIFICAÇÃO DE ELEMENTOS RHABDOVIRAIS ENDÓGENOS (EREs) EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS E ADULTOS DE *Lutzomyia longipalpis* E OUTROS FLEBOTOMÍNEOS / Monique de Souza Zezza Ramalho. - Rio de Janeiro, 2021.

110 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

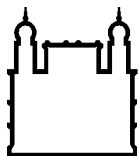
Orientadora: Yara Traub Csekö.

Co-orientador: Antonio Jorge Tempone.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Lutzomyia longipalpis*. 2. Flebotomíneos. 3. Rhabdovirus. 4. Nucleocapsídeo. 5. RNA Polimerase. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

MONIQUE DE SOUZA ZEZZA RAMALHO

### **Identificação de elementos rhabdovirais endógenos (EREs) em células embrionárias, adultos de *Lutzomyia longipalpis* e outros flebotomíneos**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Yara Maria Traub Csekö**

**Aprovada em: 12/02/2021**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Reginaldo Peçanha Brazil (FIOCRUZ/RJ) - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Felipe Arley Costa Pessoa (FIOCRUZ/AM)  
**Prof. Dra.** Myrna Cristina Bonaldo (FIOCRUZ/RJ)  
**Prof. Dra.** Ana Cristina Bahia Nascimento (BCCF/UFRJ) - **Suplente 1**  
**Prof. Dra.** Luciana Ordunha Araripe (FIOCRUZ/RJ) - **Suplente 2 e revisora**

Rio de Janeiro, 12 de Fevereiro de 2021

Com todo amor do mundo,  
dedico esta dissertação  
aos meus pais queridos  
que sempre me apoiaram  
e acreditaram em mim,  
Sueli e André ♥

## AGRADECIMENTOS

Gosto quando chega o “grande dia” de escrever meus agradecimentos. Sempre escrevo quando chega na fase final, depois de todo o trabalho ter sido redigido.

Definitivamente, o ano de 2020 foi o mais difícil que enfrentei até hoje, mas também foi um ano em que descobri a força que carregava dentro de mim. E ressignifiquei os termos ‘amizade, amor, respeito, empatia, luto, dor e resiliência’.

Agradeço a Deus com muito amor e fé, que me sustentou de pé nos dias em achei que não teria forças para prosseguir. Nos dias em que chorei de desespero, medo e tive minha fé abalada. Obrigada Senhor, por ter cuidado de mim e do meu coração nos dias mais difíceis da minha vida e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho. Elas me ajudaram a superar meus medos, minhas perdas e acreditar em mim. Elas ajudaram a deixar meus caminhos menos duros e doloridos.

“O meu corpo e o meu coração poderão fraquejar, mas Deus é a força do meu coração e a minha herança para sempre.” Salmos 73:26.

Aos meus pais que eu amo mais que tudo nessa vida, Sueli (para sempre em nossa memória) e André. Dediquei este trabalho para eles, que sempre foram a minha fortaleza. Eles sempre me fizeram sentir tão amada e especial. Minha mãezinha hoje é meu anjinho da guarda, que vai estar viva para sempre em meu coração. Sempre vou lembrar dos ensinamentos que ela me deixou. Um dia eu disse para ela que não queria viver num mundo em que ela não existisse, e em meio às nossas conversas ela me disse “... além da vida estarei sempre com você!” E sim, ela está! Como te prometi, hoje estou aqui na reta final do meu mestrado, meu amor! TE AMO PARA SEMPRE! ♥ Meu paizinho é o meu heroi, meu melhor amigo! É o meu grande amor. A personificação de amizade, companheirismo e amor, meu exemplo dentro de casa todos os dias! Minha alegria é chegar em casa e ver você, poder conversar com você todos os dias. EU TE AMO MUITO! ♥

À toda minha família! Eu amo cada um de vocês. Em especial, minha avó, Vilma, que eu amo MUITO! Admiro MUITO! Respeito MUITO! Obrigada pelas palavras de carinho e pela força sempre!

Minha tia Ana, sempre muito atenciosa e carinhosa. Tem um coração tão grande, que não sei como consegue carregar sem esforços

Minha prima/irmã Bruna Beatriz, por todos os momentos de alegrias, reflexões e muitos abraços! Nós nos parecemos muito em tantas coisas! Obrigada por tudo que vivemos juntas e que ainda vamos viver. A irmã caçula que eu nunca tive.

Ao meu bichinho favorito no mundo inteiro, Helena. Por você sinto um desejo enorme de ser uma pessoa melhor a cada dia, de ser um bom exemplo (mesmo eu só ensinando bobeira hahaha).

Aos meus primos Taís, Vaguinho, Mirian e Dida, o meu muito obrigada por TUDO! Vocês não sabem a força que carregam dentro de vocês! São incríveis e fazem de tudo para manter toda a união dessa família Raimundão!

À minha tia Edileusa, que é uma mulher tão forte! Quando penso nela, penso em bondade. Penso em força. Penso em carinho.

Ao meu tio amado Izaias (em memória para sempre), que saudades! Queria muito que você pudesse nos ver e saber o quanto evoluímos e crescemos desde que você se foi.

Ao meu grande amigo e conselheiro, Arlis. Vivemos juntos um relacionamento de quase uma década e nestes anos, compartilhamos muitos momentos. Em dias tão difíceis, sempre soube que poderia contar com ele. Obrigada pelas palavras de carinho e por poder dividir minhas dores e minhas frustrações e sempre poder ouvir palavras de apoio de você! Eu oro pela sua vida, de sua família que sempre me acolheu tão bem e da sua mãe querida, D. Lourdes, que eu amo de coração! Uma mulher linda e doce. Todos os anos que convivi com ela, aprendi muita coisa que carrego comigo até hoje.

A todos os meus amigos! Nos momentos que precisei, tive o suporte de cada um de vocês. Em especial: minha irmã de alma, amizade de Deus para a minha vida, Thais Silva. Eu poderia ficar aqui longas horas escrevendo sobre tudo que vivemos até hoje (hehe). Ela sempre foi meu refúgio. Estar com ela sempre me trouxe paz. Conversar com ela sempre me acalmou. Tinham dias em que realmente eu estava tão desanimada, mas bastava que ela chegasse ao laboratório, e o dia ficava leve e animado! Ela não faz ideia de quantas vezes contei os minutos para vê-la, o quanto fiquei feliz em contar e ouvir histórias e 'causos' do dia a dia (Que não sou poucos! Quase todo dia nosso

rêu primário fica por um fio rs), ou quantas vezes sorri quando chegou sua notificação no meu telefone. Nunca vou me esquecer do seu apoio e do seu abraço, no dia mais difícil da minha vida. Foi tão importante para mim! Sempre estarei aqui torcendo pelo seu sucesso! Seja profissional ou pessoal. Sempre vou sorrir e vibrar quando ouvir falar de você.

À minha amiga e aliada da vida, Lívia. A biomédica que vocês respeitam (haha)! Uma amizade que não cabe em poucas palavras. Lembro até hoje da primeira vez que vi seu sorriso na faculdade. Aquele sorriso doce e puro, aquela gargalhada única! Que pessoa incrível! Foram tantas histórias, que me pego sozinha rindo em casa lembrando de cada uma delas. Nossos medos na Iniciação Científica, nossas inseguranças. Nossa apresentação na RAIC. E hoje, eu vejo a grande mulher e profissional que você se tornou. Estarei sempre na primeira fileira da torcida por você! Não posso esquecer de mencionar as trollagens no laboratório (sorry hahaha). E por falar em trolagem, lembro do nosso grande amigo, Daniel. Obrigada por tudo que me ensinou quando cheguei no laboratório. Ele me ensinou tudo que tinha aprendido nos anos de IC. Me encorajou muitas vezes a seguir em frente. Você é demais! Muitas saudades de trabalhar com você!

À Natália e Dayana. Obrigada demais por tudo! Nossas terapias do dia a dia pelo whatsapp sempre são tão importantes e nos ajudam a mantermos contato, mesmo com a distância. Nat como sempre lembrada por nós três, com muuuito carinho! Nossa inspiração desde os tempos de graduação. Hoje você é dona da coisa toda hehe. Pesquisadora, professora, mãe, esposa e amiga! E maravilhosa em todos esses setores. Sempre me inspirou MUITO! Quando crescer, quero ser como você!

Ao meu presentinho lá de Rio Grande do Norte, Luiza (minha Luka)! Peço a Deus muita força para nós duas. Nossos anjinhos da guarda nos protegem agora de longe e a gente sabe a dor dessa saudade. Vamos seguindo, minha amiga!

À Carla e Vanessa, minhas amigas de longas datas! Sinto muitas saudades de vocês. Que tempos incríveis aqueles em que nos víamos todos os dias! Contem sempre comigo!

Aos integrantes do LBMPV! Laboratório onde passei anos de IC e mestrado, conheci pessoas tão incríveis. As tardes ficavam bem mais divertidas



com vocês. Com toda certeza agradeço à minha orientadora, Dra Yara Traub Csekö! Obrigada por tudo que me ensinou, sempre com muita paciência e dedicação. Você transborda amor pela ciência e isso nos incentiva muito! Sinto muito orgulho por tê-la como minha orientadora!

Obrigada ao meu coorientador, Dr. Antonio Tempone. Foram muitos ensinamentos de Biologia Molecular, que com certeza vou carregar comigo por onde eu for.

À Violeta. Nosso amorzinho colombiano. Que saudades! Lembro como choramos na sua despedida. O laboratório ficou tão vazio sem você. Levamos muito tempo para conseguirmos dar conta das compras no laboratório, mas do jeitinho sempre tão organizado que você fazia, só você mesma! Meu agradecimento também ao David (Deividiii) hahaha. Obrigada pelos momentos de conversas e descontração.

Ao Gabriel Negresca (haha... ou seria Mc Biel? Thais lembra dessa rs). O seu amor por ciência, a leveza com que você explicava tudo com uma riqueza de detalhes, sempre me incentivou. Obrigada por tudo que você me ensinou. Ah, sempre que trabalho no fluxo, lembro das suas dicas! Cada uma delas. E hoje, mesmo de longe, ainda me salva com protocolos pelo whatsapp!

À Andrea (minha primeira coorientadora), Daisy (nossa margarida apaixonada por um cafezinho e por ter nos presenteado com o Gael), Tati, Erich, Bianca.

À Juju Suhett, linda por dentro e por fora! Obrigada pelos momentos no laboratório. Nunca superamos que você nos deixou :( volte agora a ser aluna de IC da Thais, ok?

À Jennifer (Jen Jen ou Jenniféér) rs. Obrigada pelos tempos no laboratório. Dias de comemoração por ter manga na salada hahaha. Voe e brilhe muito! A gente se esbarra por aí!

À Érika o meu muito obrigada, de coração! Na reta final do meu mestrado, me ajudou muuuito na bancada e nas conversas sobre diversos assuntos no laboratório, que deixavam nossas tardes descontraídas. Para você que é fã, segue essa referência: “Luke, I am your father.” rs

À Claudia, nossa mineirinha. Obrigada pelas palavras de tanto carinho durante esses últimos anos. Nossas conversas descontraídas, nossa troca de experiências de diversas situações, me ajudaram bastante a seguir. Obrigada

pelos flebs que me cedeu para as extrações na bancada e por me auxiliar com o experimento de imunização (junto com a Érika). Sem vocês, não teria sido possível realizá-lo.

Às amizadas que fiz nas disciplinas/cursos/congressos ao longo do mestrado: Luíza, Helô, Karine, Edgar, Hecylana, Áurea, Flávia e Márcia.

Luíza é um ser humano iluminado! Só tenho a agradecer por ter tido a honra de conhecer!

À Fernanda, Ellen e Marcela. Sempre prontíssimas a nos ajudar com compras, entregas, boletos e notas fiscais. E sempre de tão bom humor, que deixam os momentos de burocracias tão descontraídos.

À Dona Marisa, que saudade! Esta senhora tem muuuuita história para contar! Sinto saudade de vê-la pelos corredores da Fiocruz. Para ela, nunca tem tempo ruim! Sempre trabalhando com um sorriso no rosto. Isso alegra o dia de qualquer pessoa. A energia que ela transmite é maravilhosa!

À Pós-graduação (Biologia Celular e Molecular – BCM/FIOCRUZ) de excelência, da qual tenho muito orgulho de ter feito parte! À coordenação e todo o corpo docente. À Julimar, a rainha da pós-graduação! Quando penso em competência, me vem esta mulher em mente! A secretária da PG que todos amam!

Aos nossos colaboradores! Sem vocês, este projeto não teria sido realizado!

Obrigada à minha revisora, Dra Luciana Araripe! Suas sugestões me ajudaram muito!

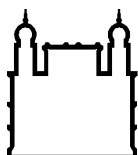
Aos membros da minha banca de defesa e suplentes (Dr Reginaldo Brazil, Dr Felipe Pessoa, Dra Myrna Bonaldo, Dra Ana Bahia e Dra Luciana Araripe), muito obrigada por terem aceito fazer parte deste momento tão importante para mim!

À Fiocruz pelo suporte financeiro e o apoio à pesquisa!

Viva à ciência!

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,  
participar da **responsabilidade coletiva** por toda a humanidade.”

(MARIE CURIE)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Identificação de elementos rhabdovirais endógenos (EREs) em células embrionárias, adultos de *L. longipalpis* e outros flebotomíneos

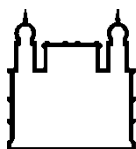
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Monique de Souza Zezza Ramalho

Insetos vetores são responsáveis pela transmissão de diferentes patógenos. Dentre os principais insetos vetores destacam-se os flebotomíneos. Os flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os principais vetores das leishmanioses que ocorrem no Velho e Novo Mundo, respectivamente. Além de serem vetores das leishmanioses, os flebotomíneos do Velho Mundo, são reconhecidamente vetores de várias arboviroses. Pouco se sabe sobre a capacidade vetorial de flebotomíneos do Novo Mundo em transmitir viroses para humanos, mas a ocorrência de populações de *Lutzomyia spp.* naturalmente infectadas por diferentes vírus tem sido demonstrada. Nosso grupo tem desenvolvido estudos com *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil. Um dos principais modelos utilizados para estudos *in vitro* sobre *L. longipalpis* são as células embrionárias LL-5. Essas células, quando transfectadas com RNAs de dupla fita, independente das sequências desses RNAs passam a apresentar uma atividade antiviral inespecífica e o meio condicionado dessas células também é capaz de induzir esse fenótipo antiviral em células não transfectadas. A análise microscópica do meio condicionado identificou a presença de exossomos e além dessas vesículas, também foi observada a presença de possíveis partículas virais. Deste material foram identificados RNAs que codificavam para quatro diferentes proteínas de Rhabdovírus, sendo três delas de Nucleocapsídeo e uma RNA Polimerase dependente de RNA. Através de reações em cadeia da polimerase, essas sequências foram identificadas em amostras de cDNA de células LL-5, e potencialmente em amostras de insetos adultos. Nas amostras de DNA, também foi possível identificar a presença dessas sequências, indicando uma possível inserção no genoma. A presença desses elementos rhabdovirais endógenos (EREs) foi confirmada por estudos *in silico* e *in vitro*. Além disso, neste projeto investigamos a presença dessas inserções em diferentes populações de flebotomíneos do Novo Mundo. A grande maioria das amostras testadas apresentou inserção no genoma e muitas delas apresentaram também transcritos referentes às inserções. Dentre elas *L. longipalpis*, *L. umbratilis*, *Lutzomyia davisii*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia fischeri*, sendo todos esses insetos de diferentes regiões do Brasil. Porém, nenhuma das amostras do Velho Mundo testada, apresentou estas inserções no genoma, sendo estas: *Phlebotomus arabicus*, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti* e *Sergentomyia schwetzi*.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*. Flebotomíneo. Rhabdovírus. Nucleocapsídeo. Polimerase. PCR. PCR inversa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Identification of endogenous rhabdoviral elements (EREs) in embryonic cell lines and adult *L. longipalpis* and other phlebotominae sandflies

#### ABSTRACT

#### MASTER'S DISSERTATION

Monique de Souza Zezza Ramalho

Insect vectors are responsible for the transmission of different pathogens. Among the main insect vectors, phlebotomine sandflies stand out. Among these the genera *Phlebotomus* and *Lutzomyia* are the main vectors of leishmaniasis in the Old and New World, respectively. In addition to being vectors of leishmaniasis, the Old World phlebotomines are known to be vectors of several arboviruses. Little is known about the vectorial capacity of New World sandflies in the transmission of viruses to humans, although the occurrence of *Lutzomyia* spp. naturally infected by different viruses has been demonstrated. Our group has carried out various studies with *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis in Brazil. One of the main models used for *L. longipalpis* *in vitro* studies is the LL-5 embryonic cell line. These cells, when transfected with double-stranded RNAs, showed non-specific antiviral activity and the conditioned medium of these cells induces this antiviral phenotype in non-transfected cells. The analysis of the exosomal pellet by electron microscopy identified possible viral particles. In this material, RNAs that encoded four different Rhabdovirus proteins were identified. Three of them codified Nucleocapsids and one of them an RNA-dependent RNA Polymerase. Through polymerase chain reactions, these sequences were identified in cDNA samples from LL-5 cells, and later in samples from adult insects. These sequences were also identified in DNA samples, indicating a possible insertion into the genome. The presence of these endogenous rhabdoviral elements (EREs) were confirmed by *in silico* and *in vitro* studies. In this project, we also investigated the presence of these inserts in different populations of sandflies in the New World. The majority of the tested samples had insertions into the genome and many of them also had transcripts, among them *L. longipalpis*, *L. umbratilis*, *Lutzomyia davisii*, *Lutzomyia whitmani* and *Lutzomyia fischeri*, all of which are from different regions of Brazil. However, none of the tested Old World samples showed any insertions into the genome: *Phlebotomus arabicus*, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti* and *Sergentomyia schwetzi*.

Key words: *Lutzomyia longipalpis*. Sandfly. Rhabdovirus. Nucleocapsid. Polymerase. PCR. Inverse PCR.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AM Amazonas

BA Bahia

BOD Bio Oxygen Demand

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar

CE Ceará

cm Centímetro (s)

DNA Ácido desoxirribonucleico

Dr. Doutor

Dra. Doutora

GAPDH Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

IPTG Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

LL5 Célula embrionária de *Lutzomyia Longipalpis* 5 (Lapinha/MG)

Lulo Célula embrionária de *Lutzomyia Longipalpis* (Colômbia)

mg miligrama (s)

MG Minas Gerais

min Minuto

mL Mililitro (s)

mm milímetro (s)

mM Milimolar

MS Mato Grosso do Sul

mV milivolts

NcP1/NcP1.1 Nucleocapsídeo

PA Pará

pb Pares de Base

PBS Phosphate Buffered Saline

PCR Polymerase Chain Reaction

PE Pernambuco

pH Potencial de hidrogênio

PI Piauí

Pol1 Polimerase 1

Pol2 Polimerase 2

Pol3 Polimerase 3

PolHinIII Polimerase HindIII  
PolNdeI Polimerase NdeI  
PP9 Célula embrionária de Phlebotomus papatasi  
RJ Rio de Janeiro  
RNA Ácido ribonucleico  
RP49 Proteína ribossomal 49  
SFB Soro Fetal Bovino  
TAE Tris-Acetato-EDTA  
TPB Triptose Phosphate Broth  
U Unidade  
UV Ultravioleta  
VSV Vírus da estomatite vesicular  
x g Força g (Força gravitacional)  
X-GAL 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D- galactopiranosídeo  
♀ Fêmea  
~ Aproximadamente  
°Graus Celsius  
♂ Macho  
% Porcentagem  
 $\mu$ L Microlitro(s)

## LISTA DE TABELAS:

Tabela 3.1- Oligonucleotídeos utilizados para genes constitutivos de <i>L. longipalpis</i> .....	31
Tabela 3.2 - Oligonucleotídeos utilizados para gene de nucleocapsídeo.....	31
Tabela 3.3 - Oligonucleotídeos utilizados para gene da Polimerase.....	32
Tabela 3.4 - Peptídeos apresentados pelo <i>software</i> AbDesigner após análise de imunogenicidade da sequência de interesse .....	36
Tabela 4.1- Amostras de flebotomíneos do Novo Mundo investigadas no projeto.....	51
Tabela 4.2 - Amostras de flebotomíneos do Velho Mundo, provenientes do insetário da Charles University (República Tcheca), investigadas no projeto.....	56
Tabela 4.3 - Resultado inserção e transcritos de NcP1 em amostras de flebotomíneos do Novo Mundo.....	57
Tabela 4.4- Resultado inserção e transcritos de NcP2 e NcP3 em amostras de flebotomíneos do Novo Mundo.....	61

## LISTA DE FIGURAS:

Figura 1.1: Estádios da metamorfose de <i>L. longipalpis</i> . Ciclo de vida dos flebotomíneos .....	2
Figura 1.2: Insetos adultos de <i>L. longipalpis</i> .....	3
Figura 1.3: Microscopia óptica, com aumento de 400x, de células embrionárias de <i>L. longipalpis</i> .....	7
Figura 1.4: Mapa da distribuição mundial da leishmaniose visceral (LV) .....	8
Figura 1.5: O ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania sp</i> .....	10



Figura 1.6: Organograma contendo família, gêneros e vírus da ordem Mononegvirales .....	13
Figura 1.7: Representação gráfica de proteínas dos Rhabdovirus envolvidas na sua replicação .....	14
Figura 1.8: Representação esquemática do genoma de Rhabdovirus .....	15
Figura 1.9: Classificação viral por David Baltimore, 1971 .....	16
Figura 3.1: Representação esquemática da PCR inversa .....	30
Figura 3.2: Marcadores de peso molecular (ladder) da Thermo Scientific™/Invitrogen .....	32
Figura 3.3: Busca de ORFs na sequência de NcP1.1, usando o programa OrfFinder .....	35
Figura 3.4: Resultado BLASTP da ORF2 identificada através do <i>software</i> OrfFinder .....	35
Figura 4.1: Sequências de RNAs rhabdovirais identificadas no sobrenadante de células LL-5 .....	37
Figura 4.2: Alinhamento das sequências NcP1, NcP2 e NcP3 com proteínas de Nucleocapsídeo de Rhabdovirus .....	38
Figura 4.3: Árvore filogenética com as sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 e sequências de Nucleocapsídeo de outros Rhabdovirus .....	39
Figura 4.4: Amplificação de NCP1 a partir de cDNA de células LL5 .....	40
Figura 4.5: Amplificação de NCP1 a partir de DNA de células LL-5 .....	40
Figura 4.6: Presença de NcP1.1 no <i>scaffold132</i> de <i>L. longipalpis</i> Jacobina com <i>hit</i> de 100% .....	41
Figura 4.7: 1) NcP1.1; 2) íntron do gene AcetilCoA, no qual NcP1.1 está inserido. 3) Região promotora de AcetilCoA e 4) Região codificante do gene .....	41
Figura 4.8: Presença de NcP2 no <i>scaffold264</i> de <i>L. longipalpis</i> Jacobina com <i>hit</i> de 100% .....	42
Figura 4.9: 1) NcP2; 2) íntron do gene HPR65, no qual NcP12 está inserido. 3) Região promotora do gene e 4) Éxons do gene .....	42

Figura 4.10: Análises <i>in silico</i> da sequência de NcP3 .....	43-44
Figura 4.11: Esquema representativo região de NcP1.1 no genoma de <i>L. longipalpis</i> .....	45
Figura 4.12: Gel representativo de PCR com oligonucleotídeos para sequência de NcP1.1 .....	46
Figura 4.13: Análise <i>in silico</i> banda de 950 pares de base amostra de <i>L. longipalpis</i> de Serra da Tiririca (Rio de Janeiro), referente à inserção de NcP1.1 no genoma .....	47
Figura 4.14: Análises <i>in silico</i> banda de 300 pares de base da amostra de <i>L. longipalpis</i> de Santarém (Pará), referente às regiões flaqueadoras .....	48
Figura 4.15: Alinhamento da banda de 300 pares de base da amostra de <i>L. longipalpis</i> de Santarém (Pará) com as regiões flaqueadoras de <i>L. longipalpis</i> .....	48
Figura 4.16: Resultado gerado pela ferramenta LTR-FINDER na busca de retrotransposons na sequência <i>scaffold132</i> de <i>L. longipalpis</i> , que contém a sequência NcP1.1 .....	49
Figura 4.17: Resultado gerado pela ferramenta LTR-FINDER na busca de retrotransposons na sequência <i>scaffold264</i> de <i>L. longipalpis</i> que contém a sequência NcP2 .....	49
Figura 4.18: Gel representativo, mostrando amplificação de GAPDH em diferentes amostras de flebotomíneos do Novo Mundo, de forma a testar a qualidade das mesmas .....	50
Figura 4.19: Gel representativo, mostrando a amplificação de NcP1 em diferentes amostras de DNA de flebotomíneos .....	50
Figura 4.20: Gel representativo, mostrando a amplificação de NcP1 em diferentes amostras de cDNA de flebotomíneos .....	51
Figura 4.21: Mapa ilustrando locais de obtenção dos flebotomíneos usados no projeto .....	54
Figura 4.22: Amplificação da sequência de Histona em diferentes amostras de flebotomíneos do Velho Mundo .....	56
Figura 4.23: Amplificação de NcP1 em diferentes amostras de DNA de flebotomíneos do Velho Mundo .....	57

Figura 4.24: Amplificação por PCR multiplex das sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 a partir de DNA .....	60
Figura 4.25: Amplificação por PCR multiplex das sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 a partir de cDNA .....	60
Figura 4.26: Blastp com as sequências da Polimerase .....	62
Figura 4.27: Árvore filogenética com a sequências da Polimerase e sequências de Polimerase de outros vírus .....	63
Figura 4.28: Amplificação da sequência de polimerase a partir de cDNA de células LL-5 .....	63
Figura 4.29: Amplificação da sequência de polimerase a partir de cDNA de células LL-5 .....	64
Figura 4.30: PCR realizada com a combinação dos oligonucleotídeos Pol1 e Pol2 .....	64
Figura 4.31: Representação esquemática da localização do fragmento clonado em alinhamento com as demais sequências da Polimerase. Fragmento de 1647 pares de base .....	65
Figura 4.32: PCR representativa com primer Pol1 com amostras de DNA de flebotômíneos .....	65
Figura 4.33: Primeira etapa da técnica de PCR inversa. Mapa de restrição para identificação das enzimas a serem usadas e desenho dos oligonucleotídeos .....	66
Figura 4.34: Segunda etapa da técnica de PCR inversa. DNA de células LL-5 digerido com a enzima <i>HindIII</i> .....	67
Figura 4.35: PCR com DNA de LL-5 digerido e ligado.....	67
Figura 4.36: Blastp sequência Polimerase obtida através da PCR inversa (5') .....	68
Figura 4.37: Amplificações obtidas da PCR inversa para a região 3'.....	69
Figura 4.38: Alinhamento do resultado obtido da PCR inversa para a região 3' do fragmento conhecido, através da ferramenta BLAST .....	69-71

Figura 4.39: Amplificação de Pol1 em amostras de DNA e cDNA de flebotomíneos de Lapinha .....	72
Figura 4.40: PCR com oligonucleotídeo Pol1 com amostras de DNA e cDNA de células Lulo .....	72
Figura 4.41: PCR com oligonucleotídeo Pol1 com amostras de DNA e cDNA de <i>L. longipalpis</i> da Colômbia .....	73
Figura 4.42: PCR quantitativa do gene NcP2 em fêmeas de <i>L. longipalpis</i> em 1, 2 e 4 dias após alimentação sanguínea .....	74

## ÍNDICE

<b>I INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Flebotomíneos .....	1
1.1.1 Flebotomíneos do Velho Mundo.....	3
<u>1.1.1.1 Gênero <i>Phlebotomus</i> .....</u>	<u>3</u>
<u>1.1.1.2 Gênero <i>Sergentomyia</i> .....</u>	<u>4</u>
<u>1.1.1.3 Gênero <i>Chinius</i> .....</u>	<u>4</u>
1.1.2 Flebotomíneos do Novo Mundo.....	4
<u>1.1.2.1 Gênero <i>Lutzomyia</i> .....</u>	<u>4</u>
<u>1.1.2.2 Gênero <i>Warileya</i> .....</u>	<u>5</u>
<u>1.1.2.3 Gênero <i>Brumptomyia</i> .....</u>	<u>5</u>
1.2 Linhagens celulares de insetos.....	5
1.2.1 Células embrionárias de <i>L. longipalpis</i> .....	6
1.3 Leishmanioses .....	7
1.4 Leishmania.....	8
1.5 Arbovírus .....	10
1.6 Vírus de flebotomíneos .....	11
1.6.1 Vírus e flebotomíneos no Velho Mundo .....	12
1.6.2 Vírus e flebotomíneos no Novo Mundo .....	11
1.7 Rhabdovírus .....	12
1.7.1 Categorização dos Rhabdovírus de acordo com a classificação de David Baltimore .....	15
1.7.2 Taxonomia dos Rhabdovírus .....	16
1.8 Elementos virais endógenos (EVEs) integrados ao genoma de diferentes espécies .....	20
<b>II OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	25

<b>III MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Obtenção dos flebotomíneos usados no projeto.....	26
3.2 Cultivo de células .....	26
3.3 Extração de RNA total e DNA genômico .....	26
3.4 Tratamento do RNA extraído por DNase .....	27
3.5 Síntese de cDNA .....	27
3.6 Desenho de oligonucleotídeos .....	27
3.7 Reações em cadeia da Polimerase (PCR) .....	27
3.8 Eletroforese em gel de agarose ... ..	28
3.9 Clonagem .....	28
3.10 Transformação em célula competente .....	28
3.11 Minipeparação de DNA Plasmidial e digestão enzimática .....	29
3.12 Sequenciamento .....	29
3.13 Análise da expressão por PCR quantitativa (qPCR) .....	29
3.14 PCR inversa .....	29
3.15 Marcadores de peso molecular (Ladder) .....	32
3.16 Ferramentas de Bioinformática usadas .....	33
3.17 Produção de peptídeos sintéticos .....	34
3.18 Inoculação dos peptídeos em coelhos .....	36
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Resultados prévios de Nucleocapsídeo .....	37
4.2 Resultados	
4.2.1 Análises <i>in silico</i> das sequências de NcP .....	41

4.2.2 Presença de NcP1, NcP2 e NcP3 no genoma de diferentes flebotomíneos.....	49
4.3 Resultados prévios de RNA Polimerase .....	62
4.3.1 Resultados da RNA Polimerase .....	64
4.4 Análise de expressão gênica de NcP2 em <i>L. longipalpis</i> infectados por VSV .....	73
4.5 Identificação de possíveis traduções das sequências rhabdovirais transcritas .....	74
<b>V DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>VI CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. O gênero *Lutzomyia*, dentre outros gêneros do Novo Mundo, é o que representa o maior número de espécies e possui a maior distribuição geográfica em todo o continente americano (Young e Duncan, 1994; Rocha, 2001; Galati, 2003; Brazil, 2006; Brandão-filho, 2010; e Galati, 2013).

Em 2003, Galati propôs uma nova classificação para flebotomíneos. Com base em sua classificação, o grupo Phlebotomini inclui mais de 500 espécies existentes divididas em seis subgrupos:

***Phlebotomina*** (gênero *Phlebotomus*, 110 spp.)

***Australophlebotomina*** (gênero *Australophlebotomus*, 10 spp.)

***Brumptomyiina*** (gêneros *Brumptomyia* [26 spp.] e *Oligodontomyia* [3 spp.]

***Sergentomyiina*** (*Sergentomyia* [310 spp.], *Deanemyia* [5 spp.] e *Micropygomyia* [55 spp.]

***Lutzomyiina*** (*Sciopemyia* [8 spp.], *Lutzomyia* [74 spp.], *Migonemyia* [7 spp.], *Lutzomyia* [57 spp.], *Dampfomyia* [20 spp.], *Expapillata* [2 spp.], *Pressatia* [8 spp.], Gêneros *Trichopygomyia* [16 spp.] e *Lutzomyia* [42 spp.]

***Psychodopygina*** (*Psathyromyia* [43 spp.], *Viannamyia* [4 spp.], *Martinsmyia* [11 spp.], *Lutzomyia* [6 spp.], *Lutzomyia* [40 spp.], *Nyssomyia* [20 spp.] e *Trichophoromyia* [39 spp.] gêneros). Esta classificação é amplamente utilizada atualmente (Galati, 2014 apud Gradoni, 2018).

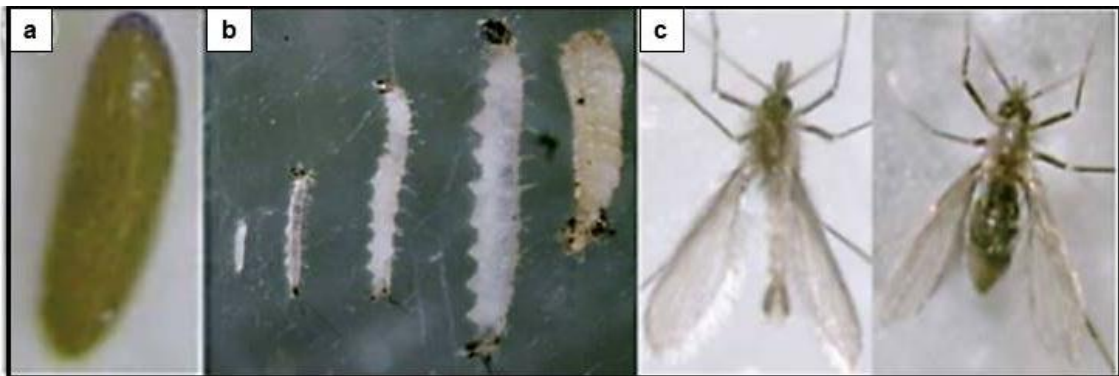
Os flebotomíneos possuem de 1 a 3 mm, seu corpo é recoberto por cerdas e têm hábitos crepuscular e noturno. São insetos holometábolos, pois passam por todas as fases de desenvolvimento, realizando assim a metamorfose completa, desde o ovo, larva (com quatro estádios), pupa até o inseto adulto (**Figura 1.1**). Machos e fêmeas de flebotomíneos são fitófagos (se alimentam de seiva de plantas e néctar de flores) e apenas as fêmeas realizam alimentação sanguínea (Young e Duncan, 1994). A hematofagia é necessária em diversas espécies para obtenção nutricional e nas fêmeas dos



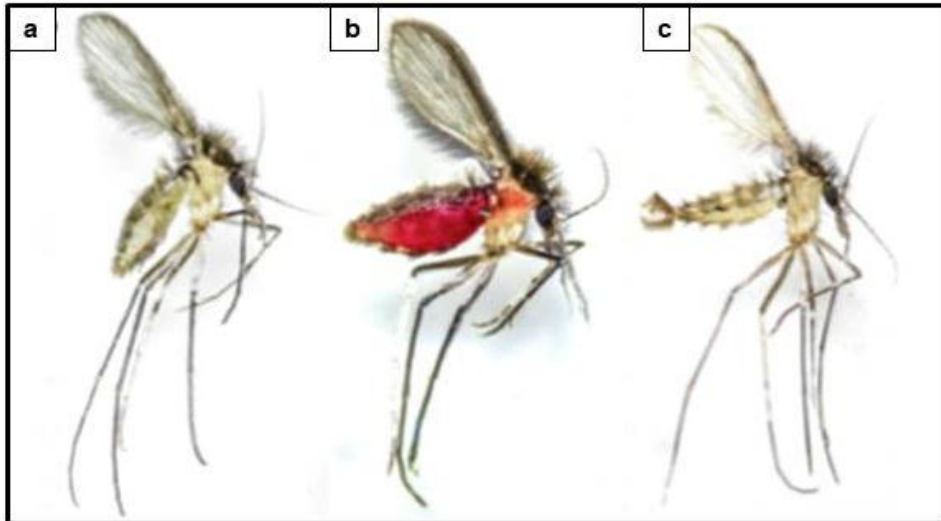
flebotomíneos, como em outros insetos, essa alimentação ocorre para a maturação dos ovários e produção de ovos (Carrera, 1991).

A hematofagia realizada pelos insetos pode ser subdividida em solenofagia (vaso-alimentação) onde o aparato bucal forma um estilete longo, fino e perfurante, que penetra no vaso e permite a sucção sanguínea, e em telmatofagia (poço-alimentação) onde o aparato bucal rasga/dilacera a pele e pequenos vasos, formando uma poça de sangue no tecido subcutâneo, onde ocorre a ingurgitação (Lehane, 2005). Os flebotomíneos se alimentam por telmatofagia. A hematofagia faz com que algumas espécies de flebotomíneos sejam vetores de diversos agentes etiológicos, como protozoários do gênero *Leishmania*, bactérias e vírus (Herrer and Christensen, 1975; Depaquit et al., 2010; Alkan et al., 2013; Maroli et al., 2013).

Após o repasto sanguíneo, quando ocorre a cópula, a fêmea iniciará o processo de oviposição, que ocorre no solo repleto de matéria orgânica. Os ovos eclodem de 7 a 10 dias após a postura. As larvas se alimentam de forma abundante e se desenvolvem no período de 20 a 30 dias; a fase de pupa tem duração de cerca de 7 a 14 dias e o inseto adulto vive em torno de 20 dias (**Figuras 1.1 e 1.2**).



**Figura 1.1:** Estádios da metamorfose de *L. longipalpis*. Ciclo de vida dos flebotomíneos: a) Ovo, b) Estádios larvais e pupa, e c) Inseto adulto, macho e fêmea, respectivamente. Imagens cedidas pelo Dr. André Nóbrega Pitaluga (2007).



**Figura 1.2:** Insetos adultos de *L. longipalpis*: a) Fêmea, b) Fêmea alimentada, e c) Macho. Imagem cedida por Msc. Gabriel Negreira (2016).

### 1.1.1 Flebotomíneos do Velho Mundo

Os flebotomíneos do Velho Mundo incluem três gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, que são encontrados nas regiões paleártica, afrotropical, oriental e australiana (Gradoni, 2018).

#### 1.1.1.1 Gênero *Phlebotomus*

Inclui 13 subgêneros: *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Kasauliulus*, *Larroussius*, *Madaphlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotlebotomus*, *Phlebotomus*, *Spelaphela* e *Transphelaphelaphela*. Eles estão presentes apenas no Velho Mundo e são particularmente prevalentes na região Paleártica, que é a principal área temperada do Velho Mundo. A maioria das espécies de *Phlebotomus* habita áreas semiáridas e savanas, e não são de florestas. Portanto, a distribuição geográfica se estende das regiões do Mediterrâneo, Afrotropical, Oriente Médio e Oriente até a Ásia central. Eles são encontrados em uma ampla gama de altitudes, de Jericó da Palestina (~300 metros abaixo do nível do mar) a Mashad no Irã (3.600 metros acima do nível do mar). Em áreas tropicais, apenas algumas espécies de *Phlebotomus* estão presentes, como na África Subsaariana, Sudeste Asiático ou na região do Pacífico. Alimentam-se

principalmente em mamíferos, embora haja algumas exceções. São vetores da leishmaniose cutânea e visceral humana (Gradoni, 2018).

#### 1.1.1.2 Gênero *Sergentomyia*

É subdividido em dez subgêneros: *Capensomyia*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Parvidens*, *Rondonomyia*, *Sergentomyia*, *Sintonius*, *Spelaeomyia* e *Vattieromyia*. Os membros deste gênero são comuns no Velho Mundo e são dominantes em áreas tropicais onde as espécies de *Phlebotomus* são escassas. Sua distribuição compreende as regiões Afrotropical, Oriental e Australásia, a sub-região indiana, a África Subsaariana e a Ásia. A maioria das espécies se alimenta principalmente de vertebrados de sangue frio. Descobriu-se que alguns espécimes de *Sergentomyia* contêm *Sauroleishmania* (um subgênero de *Leishmania*) e parasitas do gênero *Trypanosoma*, que são frequentemente identificados como parasitas de lagartos (Gradoni, 2018), mas as evidências atuais apontam que flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* são refratários às espécies de *Leishmania* que infectam humanos (Volf, P., 2013).

#### 1.1.1.3 Gênero *Chinius*

Inclui quatro espécies conhecidas: *Chinius junlianensis*, *C. barbazani*, *C. eunicegalatae* e *C. samarensis*. São encontrados em cavernas em regiões montanhosas altas (Gradoni, 2018).

#### 1.1.2 Flebotomíneos do Novo Mundo

Incluem três gêneros: *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomyia*, que são encontrados nas regiões Neártica e Neotropical (Gradoni, 2018). Destes, apenas *Lutzomyia* é vetora de leishmaniose.

### 1.1.2.1 Gênero *Lutzomyia*

É um gênero grande, com mais de 400 espécies e vários subgêneros, incluindo *Coromyia*, *Dampfomyia*, *Evandromyia*, *Helcocyrtomyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Lutzomyia*, *Pressatia*, *Psathyromyia*, *Lutzomyia*, *Sciopemyia*, *Trichophoromyia*, *Trichopygomyia* e *Viannamyia*. O gênero *Lutzomyia* é mais diverso do que seus homólogos do Velho Mundo. No entanto, as espécies vetoras são encontradas apenas em alguns subgêneros. Os flebotomíneos são abundantes na América tropical. *Lutzomyia* é o gênero mais importante em termos de diversidade de espécies e importância médica e exibe uma ampla área de distribuição. Os flebotomíneos são encontrados principalmente em áreas florestais da América do Sul e Central (Gradoni, 2018).

### 1.1.2.2 Gênero *Warileya*

Inclui seis espécies, que são encontradas principalmente na ecozona Neotropical (Gradoni, 2018).

### 1.1.2.3 Gênero *Brumptomyia*

Compreende cerca de 20 espécies, amplamente distribuídas nas Américas do Sul e Central. Nenhuma dessas espécies é conhecida por se alimentar de sangue humano. Esses flebotomíneos normalmente são encontrados em tocas de tatu e, às vezes, em troncos de árvores (Gradoni, 2018).

## **1.2 Linhagens celulares de insetos**

Linhagens celulares constituem um sistema simples, homogêneo, sensível e reprodutível, sendo assim, uma importante ferramenta devido à sua capacidade de detectar pequenas mudanças frente a diferentes estímulos. Muitas células de insetos têm sido utilizadas como modelo para estudar aspectos da biologia desses organismos.

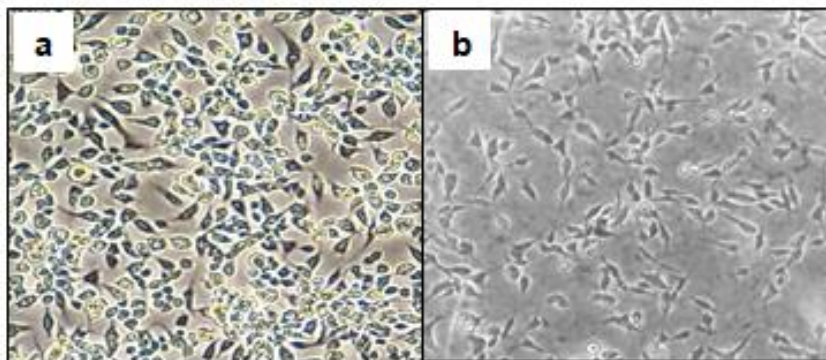
Estudos anteriores mostram que algumas linhagens, como células S2 de *Drosophila melanogaster*, células C7-10 e C6/36 de *Aedes albopictus*, Aag-2 de *Aedes aegypti*, Lulo/LL-5 de *L. longipalpis*, entre outras, são modelos eficazes para a compreensão de eventos imunológicos de insetos (Tanji et al., 2007; Moon et al., 2011; Barletta et al., 2012; Tinoco-Nunes et al., 2016). Em mosquitos, as linhagens C6/36 e Aag-2 expressam várias moléculas efetoras da imunidade, incluindo peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Moon et al., 2011).

### 1.2.1 Células embrionárias de *L. longipalpis*

Pela maior facilidade no manuseio e maior reprodutibilidade dos resultados, linhagens celulares de flebotomíneos têm sido usadas como modelo para estudar diversas interações moleculares (Pitaluga et al., 2008, Tinoco-Nunes et al., 2016 e Martins-da-Silva et al., 2018). Em *L. Longipalpis*, duas linhagens celulares foram estabelecidas: células LL-5 (Tesh e Modi 1983) e células Lulo (Rey et al., 2000) (**Figura 1.3**).

A linhagem LL-5 foi iniciada a partir de várias centenas de ovos de *L. longipalpis*, 3-5 dias após a oviposição. Os ovos usados para iniciar a cultura eram de uma colônia fechada mantida na Unidade de Pesquisa de Arbovírus de Yale. Os progenitores desta colônia foram obtidos de Louis C. Rutledge, Letterman Army Institute of Research, San Francisco, e eram descendentes da colônia original de *L. longipalpis* proveniente de Lapinha, MG, Brasil, estabelecida na Inglaterra por Killick-Kendrick et al. 1976.

A linhagem Lulo foi obtida de formas imaturas (ovos embrionados e primeiro estágio larval), que foram retirados da colônia estabelecida no Instituto Nacional de Saúde da Colômbia, Laboratório de Entomologia; esta colônia foi estabelecida com espécimes coletados em El Callejón, perto da cidade de Ricaurte no departamento de Cundinamarca, Colômbia, em dezembro de 1994 (Rey et al., 2000).



**Figura 1.3:** Microscopia óptica, com aumento de 400x, de células embrionárias de *L. longipalpis*. a) Células LL-5 e b) Células Lulo. Imagens: Dra. Ilyia Violeta Llanos (2016) e Monique Zezza (2018).

### 1.3 Leishmanioses

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2017). São transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos infectados com parasitas do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas: a leishmaniose tegumentar, que acomete a pele, envolvendo com frequência face e tronco, a forma mucocutânea, que atinge pele e mucosas podendo causar lesões desfigurantes na face; a leishmaniose cutâneo-difusa, que pode disseminar-se por todo corpo; e a leishmaniose visceral, que acomete as vísceras, sendo a forma mais grave da doença podendo levar a óbito em casos não tratados (WHO, 2015). As manifestações dessas formas variam dependendo da espécie do parasita e do estado imunológico do hospedeiro vertebrado (Gradoni, 2018).

A leishmaniose cutânea (LC) é causada principalmente por *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis*. Em termos de morbidade está concentrada em alguns países em desenvolvimento na Ásia, África e América do Sul (Gradoni, 2018).

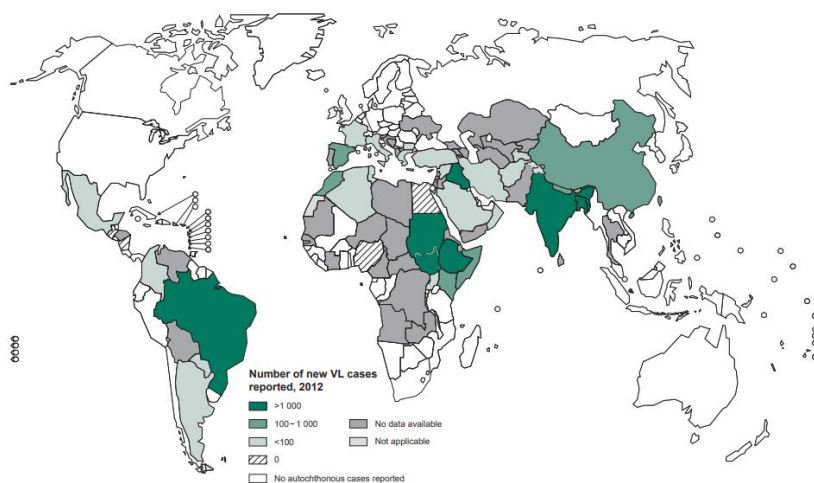
A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave da doença, pois pode acometer órgãos vitais do hospedeiro e quando não tratada, pode levar a óbito em até 90% dos casos (Ministério da Saúde, 2014). O Brasil é um

dos países com maiores incidências de casos de LV, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (**Figura 1.4**).

Entre as regiões endêmicas em cinco continentes, há uma incidência estimada de 0,7-1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 0,2-0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (LV) no mundo (Vélez et. al, 2012).

Raposas e marsupiais são possíveis reservatórios silvestres. Já no ambiente urbano, o cão é a principal fonte de infecção para o vetor (Ministério da Saúde, 2014). A leishmaniose canina é um problema grave e estima-se que mais de dois milhões de cães estejam infectados apenas na bacia do Mediterrâneo (Moreno et. al, 2002).

Em 2019, os países com maior número de casos notificados foram Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052), que juntos representam 77% dos casos na Região (OPAS, 2020).



**Figura 1.4:** Mapa da distribuição mundial da leishmaniose visceral (LV). Nas áreas mais escuras, regiões com mais de 1000 casos reportados. Fonte: Organização Mundial de saúde, 2014.

## 1.4 Leishmania

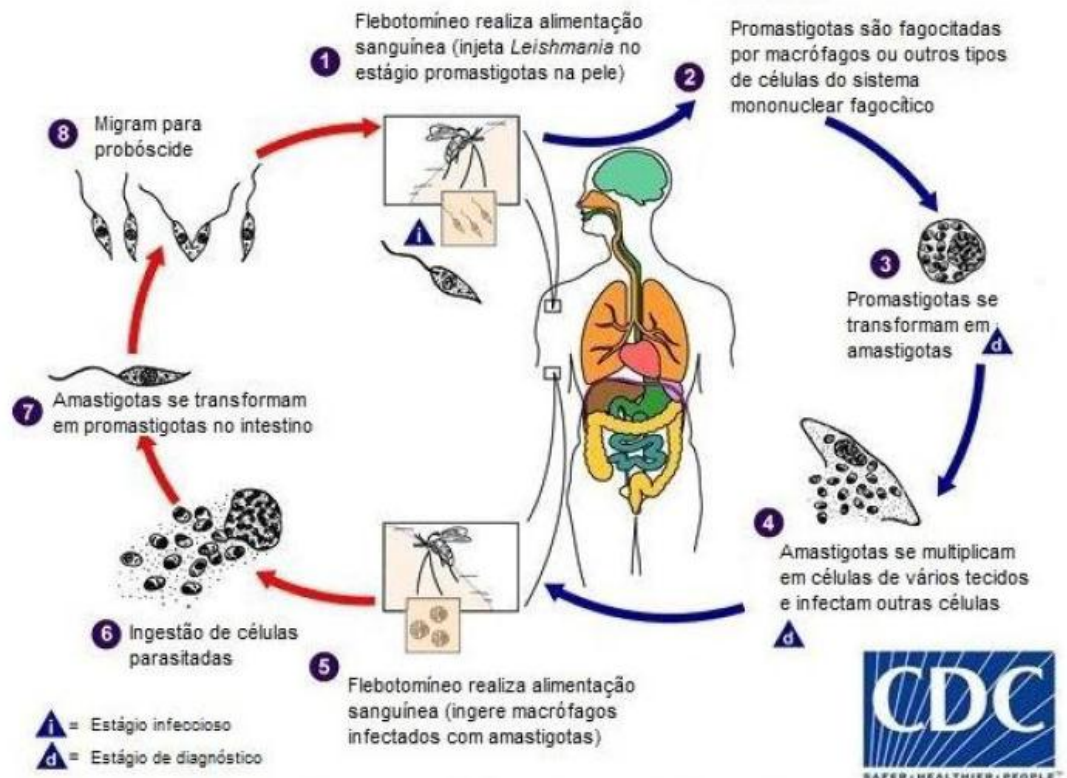
O parasita *Leishmania* pertence ao Reino Protista, Classe Kinetoplastidea, Subclasse Metakinetoplastina, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae, Subfamília Leishmaniinae e gênero *Leishmania* (Gradoni, 2018). O parasita se apresenta sob duas formas básicas: a forma flagelada denominada promastigota encontrada em hospedeiros invertebrados

e a forma amastigota sem flagelo, encontrada no interior de células do hospedeiro vertebrado (Ward, 1985; Lainson & Shaw, 1987).

Atualmente são conhecidas cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem (WHO, 2015). Estes parasitas se desenvolvem no intestino de seus vetores flebotomíneos. O gênero *Leishmania* no Novo Mundo compreende várias espécies que são agentes causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo as espécies do subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) colombiense*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lindenbergi*. Já as espécies do subgênero *Leishmania* são: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania venezuelensis*, *Leishmania pifanoi*. A principal espécie causadora da leishmaniose visceral (LV) no Novo Mundo é a *Leishmania infantum*, pertencente ao subgênero *Leishmania* (Lainson, 2010).

O ciclo da leishmaniose se inicia quando as fêmeas de flebotomíneos ingerem macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. No tubo digestivo do inseto, os macrófagos se rompem e liberam os parasitas (Kamhawi, 2006). As formas promastigotas passam pela metaciclogênese, processo pelo qual estas formas tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As promastigotas metacíclicas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao intestino do inseto e por isso, migram para sua cavidade bucal (Ministério da saúde, 2007). Em um próximo repasto sanguíneo, o inseto infectado regurgita as formas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, infectando-o (Bates, 2007) (**Figura 1.5**).





**Figura 1.5:** O ciclo de vida do protozoário *Leishmania sp.*: Do lado esquerdo (5 - 8) estão as etapas da infecção por *Leishmania* no hospedeiro invertebrado; do lado direito (1 - 4) estão as etapas da infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. CDC, 2014.

## 1.5 Arbovírus

Dados recentes indicam que os insetos atuam como principais reservatórios e vetores de vírus, responsáveis pelo aumento contínuo de doenças infecciosas. Descobrir a diversidade oculta de vírus em insetos aumentará a compreensão das perspectivas ecológicas e evolutivas no surgimento de doenças virais associadas a insetos (Wu et al., 2020). Dentre as doenças virais transmitidas por vetores, pode-se citar chikungunya, dengue e Zika, que estão entre as de maior impacto na população humana. Embora essas e outras doenças virais sejam muito bem estudadas em mosquitos, ainda não se sabe muito sobre vírus transmitidos por flebotomíneos nas Américas. Na Europa, esses insetos representam importantes vetores virais (Depaquit et al., 2010).

Os arbovírus são, por definição, transmitidos por insetos hematófagos e se replicam nos artrópodes antes de serem transmitidos (Weaver, 1997). Esta é uma classe ampla de vírus e constitui o maior grupo conhecido de vírus com

537 membros registrados no Catálogo Internacional dos Arbovírus, distribuídos em diversos grupos antigênicos. As principais famílias incluem: Alfavírus, Flavivírus, Bunyavírus, Nairovírus, Flebovírus, Orbivírus, Vesiculovírus, Thogotovírus e Asfarvírus. Trinta e quatro dos duzentos tipos diferentes de arbovírus e outros vírus de vertebrados identificados na Amazônia brasileira, são comprovadamente patogênicos para o homem (Travassos et al., 1989). Dentre eles, o vírus da febre amarela nas Américas, vírus da dengue, vírus da febre oropouche, da febre do mayaro, vírus do oeste do Nilo e diversos agentes responsáveis por encefalites. Interessantemente, existem muitos arbovírus transmitidos por mosquitos (Tolle, 2009) e menor evidência de transmissão de vírus por flebotomíneos (Jenning e Boorman, 1980).

## **1.6 Vírus de flebotomíneos**

### **1.6.1 Vírus e flebotomíneos no Velho Mundo**

Os flebotomíneos estão envolvidos na transmissão de muitos agentes virais na África, Ásia e Europa. Os mais importantes são classificados no gênero *Phlebovirus* (família *Bunyaviridae*) que inclui o vírus Toscana (TOSV), e o gênero *Vesiculovirus* (família *Rhabdoviridae*), que inclui o vírus da estomatite vesicular (VSV), Chandipura (CHPV) e vírus Isfahan (ISFV) (Maroli et al., 2013). Durante a última década, novos flebovírus foram descobertos, mas ainda não foram classificados (Ayhan e Charrel 2017).

Em alguns trabalhos já foi demonstrado que infecções por flebovírus podem afetar áreas muito extensas do Velho Mundo (Europa, África, Oriente Médio, Ásia central e ocidental) (Tesh 1988; Moriconi et al., 2017). ISFV causa “febre de três dias”, enquanto TOSV causa meningite aguda e meningoencefalite (Depaquit et al., 2010). Os vírus Chandipura e Isfahan são endêmicos no Velho Mundo. O vírus Chandipura, é transmitido por flebotomíneos da espécie *Phlebotomus argentipes*, e é o principal agente etiológico de encefalite na Índia, causando altas taxas de morbidade e mortalidade (Geevarghese, 2007).

### 1.6.2 Vírus e flebotomíneos no Novo Mundo

Há estudos que relatam o isolamento de vários sorotipos do vírus da estomatite vesicular e outros tipos de vírus de *Lutzomyia* spp. na Colômbia (Tesh et al., 1987), Panamá (Peralta et al., 1974) e EUA (Nettles et al., 1990).

O vírus da estomatite vesicular, que infecta humanos e animais domésticos é amplamente endêmico no Novo Mundo, incluindo México, América Central, norte da América do Sul e leste do Brasil, bem como em áreas limitadas do sudeste dos EUA (Letchworth et al., 1999). A maioria dos estudos sobre vírus transmitidos por flebotomíneos nas Américas datam das décadas entre 70-90.

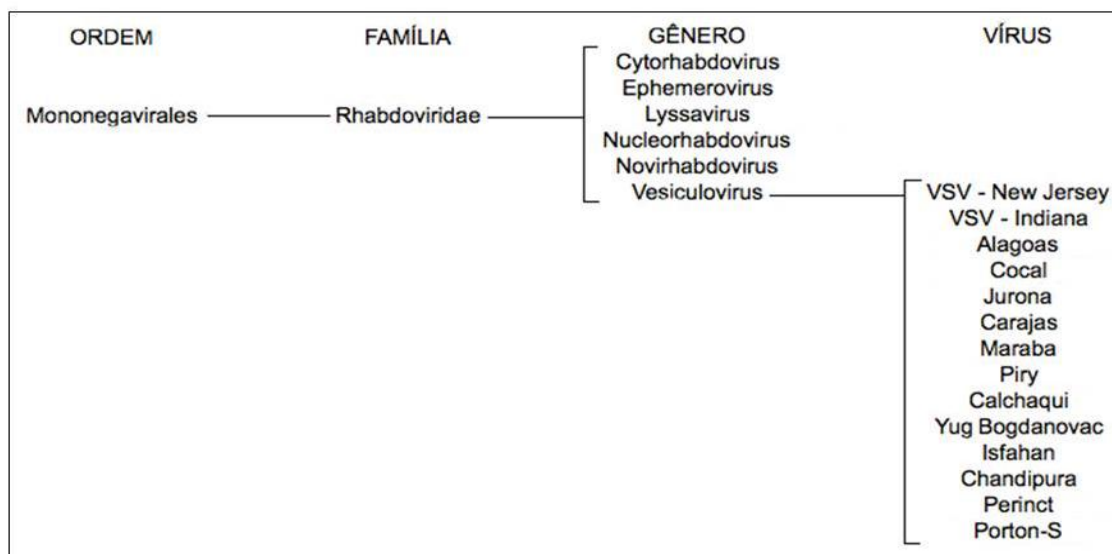
Há diversos trabalhos relatando o isolamento de arbovírus de flebotomíneos em várias áreas da Amazônia (Vasconcelos et al., 2001). Travassos da Rosa e colaboradores, 1983, identificaram oito novos flebovírus, elevando para quatorze o número de sorotipos conhecidos na região amazônica e para 36 o número total relatado mundialmente. Sorotipos são diferentes linhagens de um patógeno distinguidas pelos diferentes anticorpos que eles induzem no hospedeiro, ou com os quais reagem *in vitro* (Cândido, F., 2004-2007, Glossário de Epidemiologia).

No ano seguinte, 1984, foram isolados dois novos flebovírus de *L. longipalpis* da Amazônia. A patogenicidade desses dois vírus em camundongos e células Vero é semelhante à de VSV-Indiana e VSV-New Jersey (Travassos da Rosa, et al., 1984). Em flebotomíneos coletados do Brasil, Colômbia e Guatemala, foram isolados cinco diferentes flebovírus distintos de outros flebovírus já identificados (Tesh, B. et al., 1989). Em 2015, foi isolado um novo Flavivirus de *Lutzomyia abonnenci* do Equador, sendo este exclusivo do Novo Mundo (Alkan, C. et al., 2015).

## 1.7 Rhabdovírus

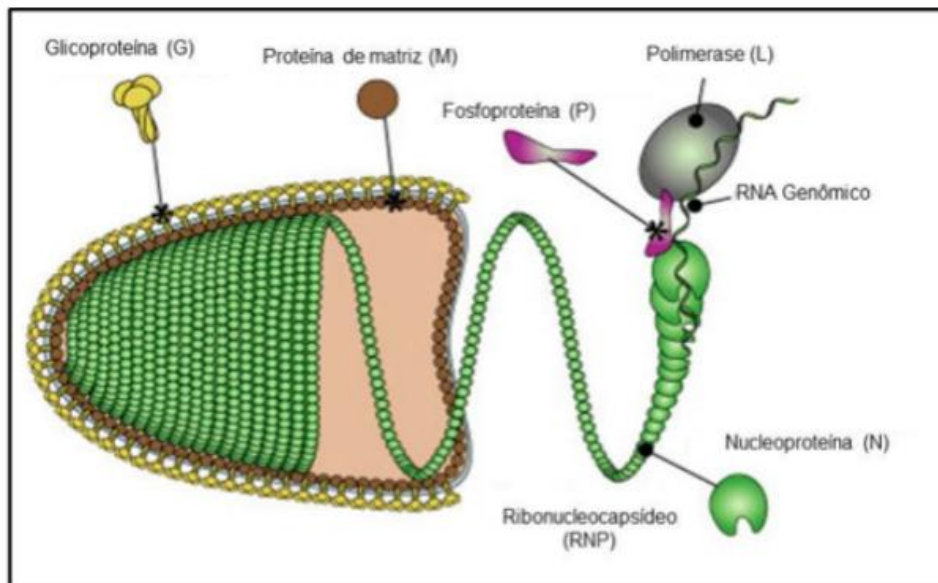
Estes vírus pertencem à família Rhabdoviridae, da ordem dos Mononegavirales (**Figura 1.6**). Nesta ordem estão agrupados os vírus que possuem como material genético o Ácido Ribonucleico (RNA) de fita simples (ssRNA), não segmentado. Estão incluídas as famílias: *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bornaviridae* e *Rhabdoviridae*. A maior parte do que se sabe sobre biologia molecular dos Rhabdovírus é derivada do estudo do vírus da

estomatite vesicular (VSV), e do vírus da raiva, protótipo do gênero *Lyssavirus* (Dezelee, 1993 apud Wunner e Paters, 1991).



**Figura 1.6:** Organograma contendo família, gêneros e vírus da ordem Mononegavirales. Adaptado de Expasy, 2017.

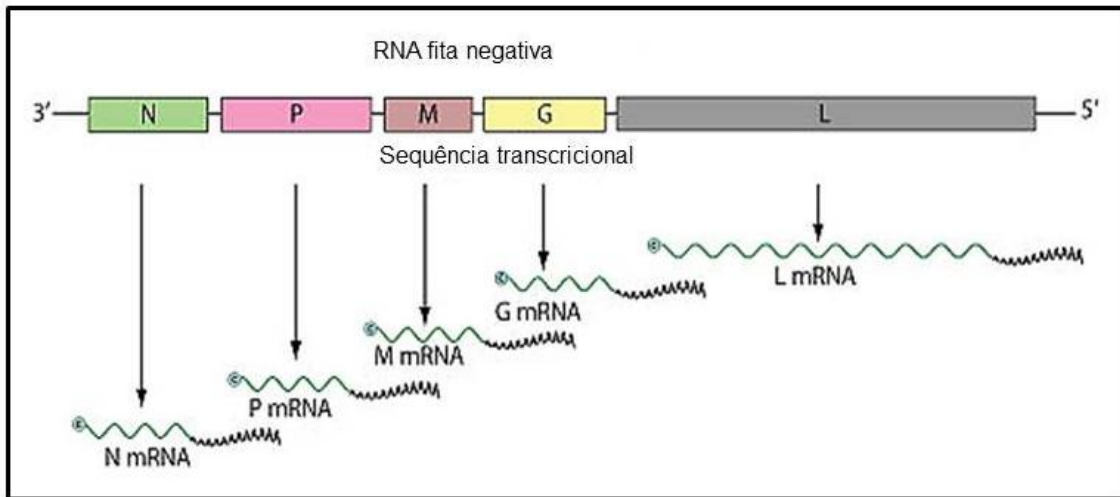
O genoma desses vírus possui de 11 a 16 kilobases de extensão. As características morfológicas e genéticas dos Rhabdovírus são: partículas virais em forma de projétil, nucleocapsídeo helicoidal, envelope com projeções glicoproteicas e genoma formado por uma única fita de RNA de polaridade negativa, a qual frequentemente codifica para cinco genes, que podem ser em maior número. Os genes são: nucleocapsídeo, que possui de 2-3 Kb de extensão, gene M, que codifica a proteína de matriz (0,8Kb), gene G, codificante da glicoproteína (~2Kb), gene P (~1Kb), que codifica o cofator da RNA Polimerase, a fosfoproteína (P) e a RNA polimerase (6Kb) (Lyles e Rupprecht, 2007). Essa família viral tem sido definida com base na alta conservação de sua estrutura em forma de bala de revólver (Lyles e Rupprecht, 2007) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7:** Representação gráfica de proteínas dos Rhabdovírus envolvidas na sua replicação. Nucleoproteína (N), RNA polimerase (L), glicoproteína (G), proteínas de matriz (M) e o cofator da polimerase, a fosfoproteína (P). Adaptado de: Viral Zone (Expasy), 2017.

A nucleoproteína (N) promove o empacotamento do genoma. A Fosfoproteína (P) possui diferentes locais com domínios para a fosforilação, os quais têm a função de regular a transcrição e a replicação. A proteína de matriz (M) é a menor e mais abundante. Participa de importantes funções, como a condensação do nucleocapsídeo durante a montagem, a união do envelope ao nucleocapsídeo, a degradação do citoesqueleto e a inibição de funções da célula hospedeira. No envelope viral, estão as Glicoproteínas, que atuam na adsorção do vírus na membrana da célula hospedeira.

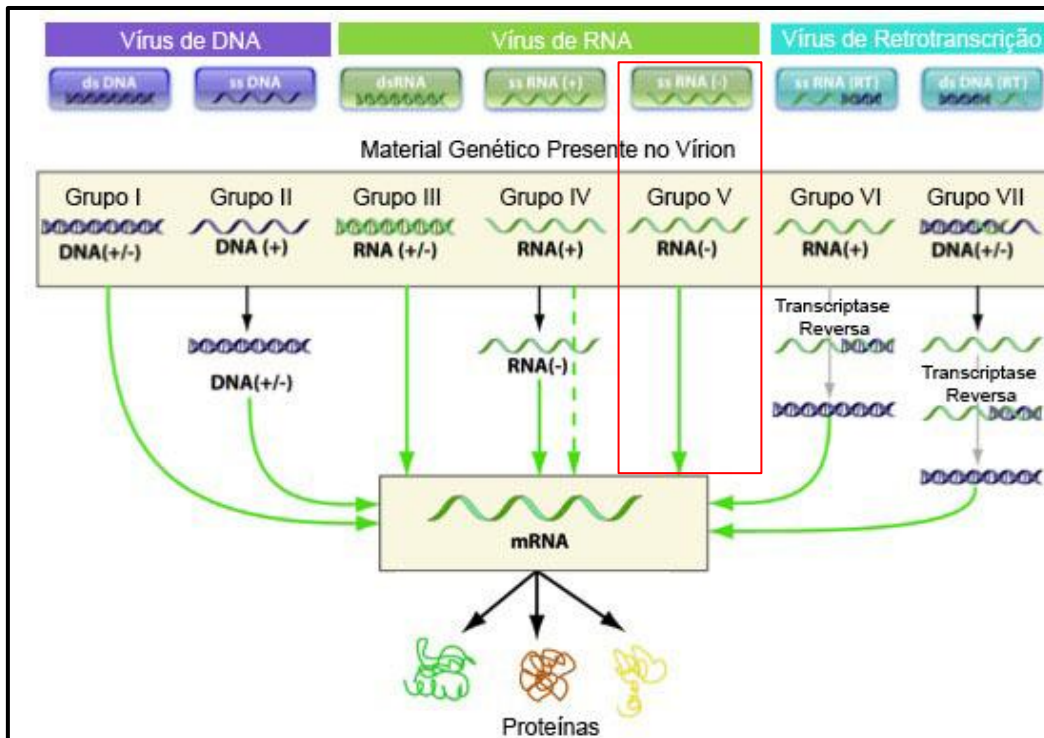
A RNA Polimerase (L) faz a transcrição do genoma viral em RNAm e a replicação do genoma no sentido positivo (antigenoma) e negativo (genoma). Esta é a maior região do genoma e seu tamanho é justificado pela complexidade das reações que a mesma realiza (Rose e Whitt, 2001; Wunner, 2002; e Walker, P. et al., 2018).



**Figura 1.8:** Representação esquemática do genoma de Rhabdovírus. Adaptado de Viral Zone (Expasy), 2017.

### 1.7.1 Categorização dos Rhabdovírus de acordo com a classificação de David Baltimore

Os vírus podem ser divididos em classes, conforme seu material genético e sua forma de replicação. Eles possuem mecanismos específicos para realizar seus processos de replicação e transcrição. Levando em consideração o material genético dos vírus e o mecanismo de replicação, os Rhabdovírus são pertencentes ao grupo V, onde se encaixam os vírus de RNA com fita simples negativa (Baltimore, 1971) (**Figura 1.9**).



**Figura 1.9:** Classificação viral por David Baltimore, 1971. Grupo onde se classificam os Rhabdovírus marcado pelo retângulo vermelho. Adaptado de [viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/254.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html).

### 1.7.2 Taxonomia dos Rhabdovírus

Rhabdoviridae uma ampla família, contendo 20 gêneros e 143 espécies e uma espécie não atribuída (vírus Moussa). Muitos Rhabdovírus ainda permanecem sem classificação.

Os vírus atribuídos a cada um desses gêneros formam um clado monofilético com base na análise filogenética de sequências do gene da RNA Polimerase. Geralmente têm genomas semelhantes, incluindo o número e a localização de genes, e têm semelhanças na gama de hospedeiros, modos de transmissão e/ou locais de replicação na célula (Walker, P. et al., 2018).

#### Hospedeiro vertebrado

##### 1) Gênero Lyssavirus;

Infectam uma ampla gama de mamíferos, incluindo humanos, nos quais podem causar encefalite fatal. A transmissão natural ocorre pela saliva, geralmente por meio da mordida de um animal infectado. O genoma é

relativamente simples, contendo os genes que codificam cinco proteínas estruturais (Walker, P. et al., 2018).

2) Gêneros Novirhabdovirus, Perhabdovirus e Sprivivirus;

Infectam peixes de várias espécies nas quais podem causar doenças hemorrágicas graves. A transmissão é pela água e também há evidências de transmissão associada ao ovo. O genoma deles é relativamente simples, contendo os cinco genes de proteínas estruturais e curtas regiões intergênicas (Walker, P. et al., 2018).

3) Gênero Tupavirus;

Foram isolados de pássaros, insetívoros e roedores, e há evidências de infecção em outros vertebrados. O genoma apresenta uma longa ORF alternativa no gene P e um gene adicional que codifica uma pequena proteína hidrofóbica entre os genes M e G (Walker, P. et al., 2018).

Hospedeiro vertebrado, vetor artrópode

1) Gênero Curiovirus;

Foram isolados de flebotomíneos e mosquitos. Hospedeiros vertebrados são amplamente desconhecidos, mas há evidências de infecção em pássaros. O genoma apresenta um ou mais genes localizados entre os genes M e G, e um ou mais genes localizados entre os genes G e L (Walker, P. et al., 2018).

2) Gênero Ephemerovirus;

Esses vírus foram isolados principalmente de mosquitos. Alguns causam uma doença febril aguda em bovinos que raramente é fatal. O genoma de Ephemerovirus apresenta vários genes entre os genes G e L (Walker, P. et al., 2018).

3) Gênero Hapavirus.

Este gênero compreende vírus que foram isolados de mosquitos e que infectam pássaros e mamíferos. O genoma é grande e complexo,



apresentando vários genes entre os genes P e M e entre os genes G e L (Walker, P. et al., 2018).

4) Gênero Ledantevirus;

Esses vírus infectam mamíferos; muitos foram isolados de morcegos ou roedores e alguns podem ser transmitidos por artrópodes. Alguns foram associados a doenças em humanos ou animais. O genoma é relativamente simples, mas alguns vírus apresentam um gene adicional entre os genes G e L que codifica uma pequena proteína de função desconhecida (Walker, P. et al., 2018).

5) Gênero Sripuvirus;

Esses vírus foram isolados de flebotomíneos e lagartos. O genoma codifica para uma pequena proteína transmembrana em uma ORF alternativa no início do gene G (Walker, P. et al., 2018).

6) Gênero Tibrovirus;

Alguns tibrovírus infectam gado e búfalos e são transmitidos por mosquitos; vários outros tibrovírus foram detectados em humanos, mas seu papel nas doenças humanas ainda não está claro. O genoma apresenta dois genes não identificados entre os genes M e G (Walker, P. et al., 2018).

7) Gênero Vesiculovirus;

Infectam uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e são transmitidos por insetos; alguns também podem ser transmitidos entre vertebrados por contato direto. Vários vesiculovírus causam estomatite vesicular em gado. O genoma é relativamente simples, contendo os cinco genes de proteínas estruturais e curtas regiões intergênicas, mas também pode incluir ORFs alternativos no gene P e o uso de códons de iniciação alternativos no gene M (Walker, P. et al., 2018).

## Hospedeiro invertebrado

### 1) Gênero Almendravirus;

Foram isolados de mosquitos. O genoma apresenta um gene adicional localizado entre os genes G e L (Walker, P. et al., 2018).

### 2) Gênero Alphanemrhavirus;

Vírus que foram detectados por sequenciamento de material genético de nematoides (lombrigas do filo Nematoda). O genoma é relativamente simples, contendo os cinco genes de proteínas estruturais, mas pode incluir uma pequena ORF adicional no gene M (Mx) que se sobrepõe ao final da ORF M. Nenhum alfanemrhavírus foi ainda isolado (Walker, P. et al., 2018).

### 3) Gênero Caligrhavirus;

Foram detectados em piolhos do mar (crustáceos da família Caligidae), nos quais parecem causar infecções ativas. O genoma do caligrhavirus é relativamente simples, contendo os cinco genes de proteínas estruturais, mas pode incluir um gene adicional (U1) entre os genes G e L. Nenhum caligrhavírus foi ainda isolado, mas vírions foram observados por microscopia eletrônica (Walker, P. et al., 2018).

### 4) Gênero Sigmavirus;

São vírus de moscas do gênero *Drosophila*. A infecção resulta em paralisia ou morte das moscas. O genoma pode apresentar um gene adicional (X) localizado entre os genes M e G, codificando uma proteína de função desconhecida (Walker, P. et al., 2018). O vírus sigma (DMelSV), é um patógeno natural de *Drosophila melanogaster*, e é o único Rhabdovírus específico de *Drosophila* já descrito (Longdon, B. et al., 2009).

## Hospedeiro de planta

### 1) Gênero Cytorhabdovirus;

Infectam uma ampla gama de plantas e são transmitidos por vetores artrópodes (pulgões e cigarras) nos quais se replicam. Têm um genoma não segmentado apresentando um gene adicional localizado entre o gene P e o gene M (Walker, P. et al., 2018)

### 2) Gênero Dichorhavirus;

Infectam plantas e são transmitidos pelos ácaros *Brevipalpus*. Eles causam lesões localizadas em folhas, caules e frutos de plantas economicamente importantes, como citros, café e orquídeas. O genoma dos dicorhavirus contém os genes N, P, M e G, e um gene adicional localizado entre o gene P e o gene M que codifica uma proteína de movimento putativa (Walker, P. et al., 2018)

### 3) Gênero Nucleorhabdovirus;

Infectam uma ampla gama de plantas e são transmitidos por vetores artrópodes, nos quais se replicam. Os nucleorhabdovirus se replicam no núcleo das células vegetais infectadas. O genoma apresenta um gene adicional entre o gene P e o gene M que codifica uma proteína de movimento (Walker, P. et al., 2018)

### 4) Gênero Varicosavirus;

Infectam naturalmente duas famílias de plantas (Compositae e Solanaceae). O genoma é bem simples (Walker, P. et al., 2018).

## **1.8 Elementos virais endógenos (EVEs) integrados ao genoma de diferentes espécies**

Elementos virais endógenos (EVEs) são sequências virais inteiras ou parciais integradas em genomas hospedeiros.

Os genomas dos vertebrados contêm muitas cópias de sequências retrovirais, adquiridas ao longo da evolução. Até recentemente, pensava-se

que eram o único tipo de vírus de RNA que se integrava ao genoma do hospedeiro (Vladimir et al., 2010). EVEs derivados de retrovírus são os exemplos mais conhecidos, uma vez que os retrovírus integram seu DNA no genoma do hospedeiro como parte de seu ciclo de vida durante a infecção (Suzuki et al., 2017).

Porém, há diversos estudos descrevendo a presença de sequências de vírus de RNAs não retrovirais integradas no genoma de vertebrados, invertebrados e plantas, mesmo não fazendo uso de DNA intermediário (Maori et al., 2007).

Avanços recentes na bioinformática mudaram o panorama da paleovirologia. Levantamentos *in silico* são usados para rastrear EVEs em vários genomas de animais para identificar uma série de sequências EVE não retrovirais pertencentes a várias famílias de vírus. Os elementos virais integrados geralmente acumulam mutações aleatórias que os tornam inativos. (Suzuki et al., 2017).

Em diferentes espécies de vertebrados testados, já foram detectadas diversas sequências de DNA genômico que parecem ter sido derivadas, há aproximadamente 40 milhões de anos, de famílias de vírus atualmente em circulação, com genomas de RNA de fita simples. Muitas dessas sequências foram relacionadas a famílias da Ordem Mononegavirales: Rhabdovírus, Bornavírus e Filovírus (Vladimir et al., 2010).

Estudos realizados por análises filogenéticas e sequenciamentos a partir de genomas de mamíferos, apresentaram inserções de filovírus em morcegos, roedores, marsupiais e musaranhos. Os resultados desses estudos indicam que as inserções nesses animais ocorreram há aproximadamente 40 milhões de anos e podem ser classificadas como elementos fósseis (Taylor et al., 2010).

Além dessas espécies, foram identificados também, elementos rhabdovirais integrados ao genoma de copépodes, como *Caligus rogercresseyi* e *Lepeophtheirus salmonis*, e da formiga *Camponotus floridanus*. Essas sequências codificavam para as regiões de nucleoproteína (N), RNA polimerase (L) e glicoproteínas (G), mas não foram encontradas sequências codificantes para proteínas de matriz (M) e o cofator da polimerase, a

fosfoproteína (P), o que poderia ser explicado, por essas regiões serem as menores e menos conservadas do genoma de Rhabdovírus (Fort et al., 2012).

Dentre os artrópodes de interesse como organismo modelo ou de interesse médico, foram realizados estudos e análises *in silico* em *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, o carrapato *Ixodes scapularis* e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, nos quais foi identificada a presença de fragmentos fósseis de Rhabdovírus e também de outros vírus, integrados ao genoma (Fort et al., 2012).

Tais análises também permitiram avaliar que as mesmas sequências de vírus de RNAs não retrovirais estão presentes no genoma de *Aedes aegypti* há milhões de anos e que esses mosquitos foram expostos a diversos episódios de infecção ao longo do curso da evolução, já que pelo menos metade dessas sequências integradas foram originadas de eventos integrativos independentes (Fort et al., 2012).

Também há trabalhos na literatura que identificaram inserções virais não retrovirais no genoma de flebotomíneos. Dentre eles em *L. longipalpis*, onde foram identificadas sequências de Nucleoproteína de Rhabdovírus (Fort et al., 2012) e nas espécies *Phlebotomus duboscqi* e *Sergentomyia sp.* (Vasilakis et al., 2013).

O futuro desses EVEs nas populações hospedeiras depende do papel que possam vir a desempenhar no hospedeiro. Espera-se que aqueles que sejam deletérios, ou seja, que gerem injúrias às células hospedeiras, sejam eliminados durante o processo evolutivo. Os EVEs neutros são submetidos à deriva genética e podem persistir por muito mais tempo, mas acumularão mutações aleatórias até que não possam mais ser identificados. Por outro lado, alguns EVEs podem exercer funções benéficas para seus hospedeiros. Este processo é conhecido como exaptação. Um exemplo clássico é a resistência a infecções virais (Fort et al., 2012). Essa resistência pode acontecer através da transcrição e/ou tradução dessas EVEs pelo próprio hospedeiro. Fujino e colaboradores (2014) publicaram o primeiro artigo da literatura que identifica sequências de vírus de RNA não retrovirais desempenhando funções na defesa antiviral no hospedeiro (exaptação), através da tradução de sequências *bornavirus-like* em esquilos da espécie *Ictidomys tridecemlineatus*. A proteína,

*in vitro*, se mostrou eficiente para inibir a replicação do vírus da doença de Borna.

Outro trabalho interessante, de Goic e colaboradores (2016), mostrou que DNAs derivados de vírus desencadeiam tolerância a infecções arbovirais em duas espécies de *Aedes* infectados com dois arbovírus de famílias distintas (dengue ou chikungunya), onde ocorre a inserção de sequências virais no genoma, gerando DNA viral (vDNA), que é essencial para a sobrevivência do mosquito e tolerância viral. Com a ausência de vDNA ocorre uma extrema suscetibilidade a infecções virais. Esses resultados mostram um importante papel do vDNA na tolerância viral que permite a sobrevivência do mosquito e, portanto, pode ser importante para disseminação e transmissão de arbovírus.

Alguns vírus utilizam o mecanismo de transposição para se mover dentro das células hospedeiras e assim, conseguem integrar parte do seu genoma no genoma do hospedeiro. Na maior parte dos casos, esse movimento é aleatório e ocorre em baixas frequências. No caso de vírus de RNAs não retrovirais, uma cópia de RNA do elemento é necessária para sua incorporação no DNA-alvo, atuando como um molde para o evento de integração ao genoma (Alberts et al., 2010).

O mecanismo de integração de sequências de RNAs não retrovirais no genoma ainda não está claro. Há uma possível hipótese discutida por Tasseto, M. e colaboradores, 2019, de que durante infecções virais em mosquitos, fragmentos de genomas de vírus de RNA são transcritos reversamente através da atividade de retrotransposons endógenos já no início da infecção, que resulta na formação de cDNA viral (vDNA), assim como ocorre em *Drosophila* (Goic, B. et al., 2013). Essa hipótese foi sugerida através do uso de inibidores de transcriptase reversa (RT), zidovudina (AZT) e Estavudina, que resultou no impedimento da produção de vDNA em células Aag2 infectadas com vírus Síndbis (SINV) (Goic, B. et al., 2016).

A investigação de sequências rhabdovirais em flebotomíneos se iniciou em nosso laboratório, a partir de dados obtidos num trabalho publicado pelo nosso grupo, onde as células LL-5 foram transfectadas por vários RNAs de dupla fita (dsRNAs), para estudos iniciais de silenciamento gênico em flebotomíneos. E, surpreendentemente, foram observados que, de alguma forma, esses dsRNAs não relacionados, bloqueavam a replicação/infecção viral nessas células. E

ainda, quando o meio condicionado das células transfectadas foi incubado com células naive, estas também passaram a apresentar resistência viral (Pitaluga et al., 2008). A partir de então, iniciou o interesse por saber o que poderia estar no sobrenadante dessas células, envolvido nessa imunidade antiviral inespecífica. Exossomos já são descritos na literatura, como sendo importantes no transporte de macromoléculas, atuando como comunicadores intercelulares e são relacionados à imunidade antiviral. Portanto, para analisar os exossomos de células LL-5 no meio condicionado, para compreender se estes poderiam estar relacionados à imunidade, foram realizadas ultracentrifugações. Curiosamente, além dos exossomos, puderam ser observadas também, possíveis partículas virais. O RNA total foi extraído e sequenciado, revelando 6 sequências codificantes para proteínas de nucleocapsídeo e RNA polimerase de Rhabdovírus. Foram denominadas NcP1, NcP2, NcP3, Pol1, Pol2 e Pol3.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Identificar a presença e caracterizar elementos rhabdovirais endógenos (EREs) em células embrionárias e insetos adultos de *L. longipalpis* e outros flebotomíneos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença de sequências rhabdovirais inseridas no genoma de flebotomíneos, através do uso de bancos de dados *Vectorbase* e *ViPR* e a ferramenta de bioinformática *Blast*;
- Confirmar através de PCR a presença ou ausência das sequências de genes de Rhabdovírus em flebotomíneos de diferentes localizações geográficas no Brasil;
- Investigar se essas inserções rhabdovirais estão sendo transcritas por esses insetos;
- Examinar se há tradução das sequências transcritas;



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos flebotomíneos usados no projeto**

Foram utilizados insetos provenientes de nossa colônia de *L. longipalpis*, originalmente coletados em Jacobina (Bahia - Brasil), e mantidos em insetário do nosso laboratório a 26°C e alimentados com solução de sacarose 70%. As fêmeas são alimentadas com sangue de hamster anestesiado para ovipor. As demais espécies de flebotomíneos de outras regiões foram provenientes de coletas no campo ou insetários de nossos colaboradores. Para representar amostras do Novo Mundo, insetos adultos de diversas regiões do Brasil foram cedidos pelos pesquisadores: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC – Laboratório de Doenças Parasitárias/FIOCRUZ - RJ), Dr. André Pitaluga (IOC – Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores/FIOCRUZ-RJ), Dr. Sinval Brandão (FIOCRUZ-PE), Dr. Felipe Pessoa (FIOCRUZ-AM), Dra. Rafaela Bruno (IOC/FIOCRUZ-RJ), Dr. Felipe Dias (FIOCRUZ-RJ), Dr. João Marques (Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG) e Dr. Oscar Daniel Salomón (Instituto Nacional de Medicina Tropical/Ministério de saúde – Argentina). Insetos adultos do Velho Mundo foram cedidos pelo Dr. Petr Volf (Departamento de Parasitologia/Charles University – República Tcheca).

#### **3.2 Cultivo de células**

As linhagens celulares de *Lutzomyia longipalpis*, LL-5 e Lulo, foram mantidas em meio L-15 (SIGMA – Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Laborclin) e 10% de Triptose Phosphate Broth (TPB) a uma temperatura de 28°C.

#### **3.3 Extração de RNA total e DNA genômico**

Para extração do RNA e do DNA genômico das amostras, foram seguidos protocolos do reagente TRIzol® (Invitrogen®), específicos para cada

molécula separadamente, segundo instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -80°C e o DNA a -20°C.

### **3.4 Tratamento do RNA por DNase**

Após a extração do RNA foram realizadas Reações em cadeia da Polimerase (PCR) para verificar possível contaminação com DNA genômico nas amostras. Como controle positivo da reação, foram usadas amostras de DNA previamente extraídas de células LL-5. Havendo amplificação, o que confirmava a contaminação, as amostras foram tratadas com a DNase livre de RNA TURBO DNA-free Kit (Ambion).

### **3.5 Síntese de cDNA**

A partir do RNA extraído livre de DNA genômico, a primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada com o kit SuperScript<sup>®</sup> III First-StrandSynthesis System (Invitrogen<sup>®</sup>), de acordo com recomendações do fabricante.

### **3.6 Desenho de oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos foram desenhados e analisados utilizando os programas Oligonucleotídeo-BLAST (NCBI-NIH) e AmplifX, disponíveis em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> e <https://amplifx.software.informer.com/1.7/>, respectivamente.

### **3.7 Reações em cadeia da polimerase (PCR)**

A detecção de fragmento viral nas diferentes amostras (cDNA e DNA) foi feita através de reações de PCR convencional, que resultaram na amplificação do fragmento de interesse.

As reações para síntese de cDNA foram conduzidas com condições de temperatura de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e em seguida aos ciclos uma etapa de extensão adicional de 5 minutos a 72°C.

As reações com DNA foram conduzidas com condições de temperatura de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e em seguida aos ciclos uma etapa de extensão adicional de 5 minutos a 72°C.

Oligonucleotídeos para os genes constitutivos Histona e GAPDH (**Tabela 3.1**) foram empregados nas PCRs para a confirmação da extração de RNA e DNA das amostras. Os oligonucleotídeos que se anelam nos genes alvo (Proteína de Nucleocapsídeo e Polimerase) descritos nas **Tabelas 3.2 e 3.3** foram utilizados para análise qualitativa das amostras.

### **3.8 Eletroforese em gel de agarose**

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose de 1,5% (11 x 14 cm), em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) em concentração 1X contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (C<sub>12</sub>H<sub>2</sub>OBrN<sub>3</sub>). A fonte foi regulada a 110 mV, por ~40 minutos. Após a corrida da amostra, o gel foi exposto à luz UV, através de um transluminador com câmera acoplada, para captura das imagens.

### **3.9 Clonagem**

Os produtos de PCR, após excisados do gel de agarose, foram purificados com kit PCR and gel clean up system (Promega) e, em seguida, ligados ao vetor plasmidial pGEM-T easy com ação da enzima T4 DNA Ligase (1U), ambos da fabricante Promega, seguindo instruções do fabricante para reações com volume final de 10 µL.

### **3.10 Transformação**

Alíquotas de 4 µL da reação de ligação foram incubadas por 20 minutos no gelo com células competentes DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*). Em seguida foi realizado choque térmico em banho-maria a 42°C por 90 segundos e as células foram colocadas em gelo por 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio Luria Bertani Broth (LB) às células, que foram crescidas por 45 minutos no agitador a 200 RPM. As amostras foram plaqueadas em meio LB-ágar

contendo 1  $\mu\text{L}$  de ampicilina à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$  de IPTG à 100mM e 20  $\mu\text{L}$  de X-Gal à 20  $\text{mg}/\text{mL}$ .

### **3.11. Minipreparação de DNA plasmidial e digestão enzimática**

Foram realizadas minipreparações de DNA plasmidial (miniprep) com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) e foi feita digestão enzimática de 50 ng do plasmídeo com 10 U da enzima de restrição EcoRI (Promega), por 1 hora a 37°C, seguida da inativação da enzima a 65°C por 10 minutos.

### **3.12 Sequenciamento**

Reações contendo 200-250 ng de plasmídeo pGEM-T easy contendo inserto de interesse e 3,2 pmoles de oligonucleotídeos específicos foram enviadas para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ, em 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

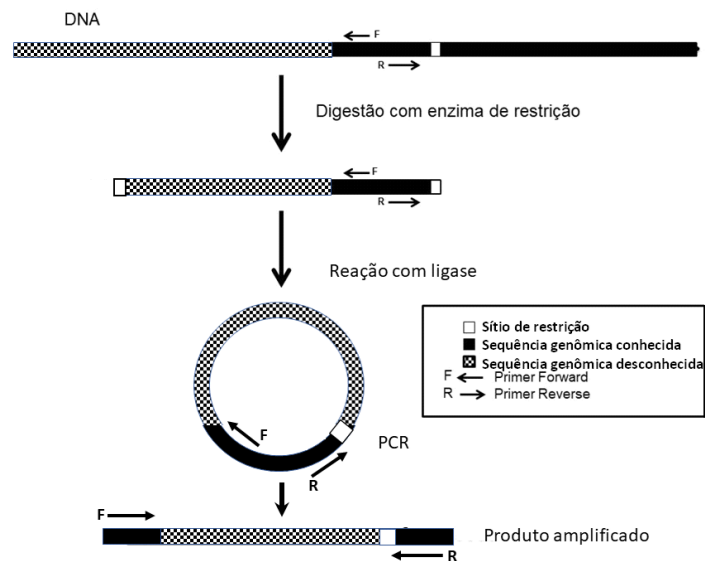
### **3.13 Análise da expressão por PCR quantitativa (qPCR)**

Esse experimento foi realizado em triplicata experimental e uma replicata biológica. Na reação, foram empregados 6 $\mu\text{l}$  de SYBRGreen 2x Mix (Applied Biosystems), 1 $\mu\text{l}$  dos cDNAs concentrados, 2  $\mu\text{l}$  de um mix com oligonucleotídeos senso e anti-senso a 1,25 $\mu\text{M}$ . O termociclador utilizado foi o Applied Biosystems StepOne e o ciclo de amplificação foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 42 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. A expressão relativa dos grupos, infectado com VSV (via oral) e o grupo controle (alimentado apenas com sangue), foram comparados ao gene constitutivo GAPDH de *L. Longipalpis* ( $\Delta\text{Ct}$ ) e, após, os grupos foram comparados entre si, através do método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak et al., 2001). As análises foram feitas no programa GraphPad Prism 5. As amostras usadas nesse experimento foram cedidas pelo Dr João Marques. A infecção dos flebotomíneos com VSV foi realizada conforme descrito por Ferreira e colaboradores, 2018.

### **3.14 PCR inversa**

Diferente do que ocorre com a técnica de PCR tradicional, onde é amplificada uma região interna, situada entre duas sequências flanqueadoras conhecidas, na técnica de PCR inversa são amplificadas regiões genômicas desconhecidas, a montante ou a jusante de uma sequência conhecida. Inicialmente é determinada a presença de sítios para enzimas de restrição na sequência conhecida.

A busca é por sítios de restrição que estejam localizados próximos às extremidades da sequência. A escolha do desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e das enzimas de restrição a serem utilizadas no experimento depende se a região de interesse está a montante ou a jusante, mas em ambos os casos o processo é o mesmo. A enzima escolhida deverá cortar a sequência conhecida uma única vez e o seu sítio estar localizado na região a jusante do sentido para onde queremos ampliar a sequência. Na figura 3.1 temos um exemplo de amplificação da sequência a montante da região conhecida. Para isso digerimos o DNA com uma enzima de restrição cujo sítio esteja localizado a jusante da que queremos amplificar. Em seguida é feita uma digestão enzimática, que resultará em fragmentos que serão submetidos a reações de ligação com a enzima T4 ligase. Posteriormente os produtos da reação de ligase são diluídos para favorecer o autoanelamento e evitar a formação de concatâmeros. Após a ligação esse material é utilizado como modelo para uma PCR. Os oligonucleotídeos são desenhados de forma a anelarem com orientação oposta entre si (**Figura 3.1**). Um dos oligonucleotídeos deve se anelar antes do sítio de restrição escolhido e o outro deve se anelar próximo à extremidade para onde a sequência deverá crescer. Ocorre depois a amplificação dos fragmentos por PCR, cujos produtos são clonados e por fim, sequenciados.



**Figura 3.1:** Representação esquemática da PCR inversa. Adaptada da dissertação de mestrado de João Ramalho Ortigão.

Oligonucleotídeos que se anelam dentro dos genes constitutivos Histona e GAPDH (**Tabela 1**) foram empregados nas PCRs para a confirmação da qualidade da extração de RNA e DNA das amostras. Os oligonucleotídeos que se anelam nos genes alvos (Proteína de Nucleocapsídeo e Polimerase) descritos nas **Tabelas 2 e 3** foram utilizados para análise qualitativa das amostras.

**Tabela 3.1:** Oligonucleotídeos utilizados para genes constitutivos de *L. longipalpis*

Nome	Sequência	Tamanho do fragmento
Histona F (senso)	5' GAAAAGCAGGCAAACACTC 3'	500pb
Histona R (sentido reverso)	5' GAAGGATGGGTGGAAAGG 3'	
GAPDH F (senso)	5' TTCGCAGAAGACAGTGATGG 3'	132pb
GAPDH (sentido reverso)	5' CCCTTCATCGGTCTGGACTA3'	

**Tabela 3.2:** Oligonucleotídeos utilizados para gene de nucleocapsídeo

Nome	Sequência	Tamanho do fragmento
NcP1a F	5' GGAACCCCAGAACGATACAA 3'	319pb
NcP1a R	5' GACAGAGGCACGCGAAGTAT 3'	

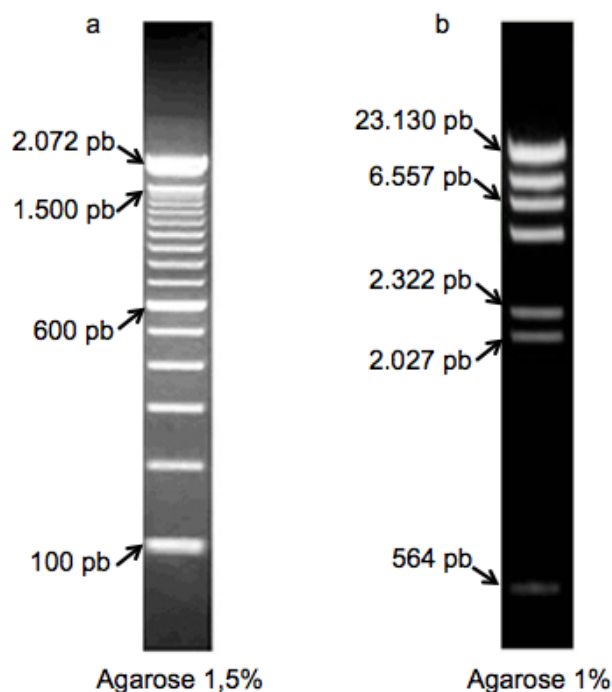
NcP2 F	5' GAACTGTGCCAAAGGGTGAT 3'	111pb
NcP2 R	5' GCAACCCCAAACCTCCTACAA 3'	
NcP3 F	5' GGATTGAGAGGGTTCC 3'	199pb
NcP3 R	5' TCGGGAACCTCCTGAGAAATACA 3'	
NcP1.1 F	5' ACCGGCTCTGGCTTTGAGCCA 3'	950pb
NcP1.1 R	5' ATGCGGCTGCAACTTCTGAGTT 3'	

**Tabela 3.3:** Oligonucleotídeos utilizados para gene da Polimerase

Nome	Sequência	Tamanho do fragmento
Pol1 F	5' AAGCCACTCTTCCCCAGATT 3'	207pb
Pol1 R	5' CCCTCCGAACCTCACAGTAA 3'	
Pol2 F	5' CCACCAACGGACAAGGTCTA 3'	203pb
Pol2 R	5' GCGTCCCAAATAGTAAACG 3'	
Pol3 F	5'TGTGATTA AACACTTCTACCAA 3'	200pb
Pol3 R	5' TCGGATTTAAACTGGCGAAC 3'	
PolHinIII F	5' CCTGGGTATCCCAATCTCAT 3'	-
PolHinIII R	5' TGCTTCTCCTCTCTGATGATTG 3'	
PolNdel F	5' GCAAGTAGGCATGTGAACTT 3'	-
PolNdel R	5' CCAGCAGAGATGTTCCGGAACAG 3'	

### 3.15 Marcadores de peso molecular (Ladder)

Os marcadores de peso molecular utilizados (**Figura 3.2**) foram o 100bp e o Lambda *Hind*III, ambos da Thermo Scientific™/Invitrogen.



**Figura 3.2:** Marcadores de peso molecular (ladder) da Thermo Scientific™/Invitrogen: a) 100bp, e b) Lambda *Hind*III



### 3.16 Ferramentas de Bioinformática usadas

As inserções genômicas identificadas em *L. longipalpis* foram investigadas *in silico* através do uso da ferramenta **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e dos bancos de dados do **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*), **VIPR** (*VirusPathogenResearch* - <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>) e **VectorBase** (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>).

#### **Blast**

*Basic Local Alignment Sequence Tools* é uma ferramenta de bioinformática usada para encontrar regiões de similaridade entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com um banco de dados de sequências e calcula significância estatística.

Disponível online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

#### **Análise das sequências**

##### **GeneStudio**

As amostras enviadas ao sequenciamento são analisadas em diferentes etapas, usando-se diferentes ferramentas de bioinformática. Para garantir maior confiabilidade e cobertura das sequências, elas são enviadas em duplicatas para a plataforma de sequenciamento. Para alinhar essas duplicatas e formar contigs, o *software* GeneStudio foi usado. Esse programa também possibilita editar/limpar as sequências, apagando possíveis ruídos que prejudiquem a análise. Disponível para baixar em: <https://genestudio.software.informer.com/>

##### **VecScreen**

Após ter os contigs formados, é importante apagar possíveis “contaminantes” das sequências, neste caso, que possam ser de origem vetorial, uma vez que nossa sequência de interesse (inserto) é ligada em vetor plasmidial. A ferramenta VecScreen permite remover esses segmentos para

que as sequências possam ser analisadas depois. Disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>

### **ClustalW**

As duplicatas de sequências de cada amostra geradas através do sequenciamento Sanger foram submetidas ao alinhamento através do software “ClustalOmega”, disponível online. O alinhamento foi realizado para validar as duplicatas. Disponível online: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

### **Jalview**

Programa para alinhamento múltiplo de sequências, visualização e análise. Disponível para baixar em: <http://www.jalview.org/getdown/release/>

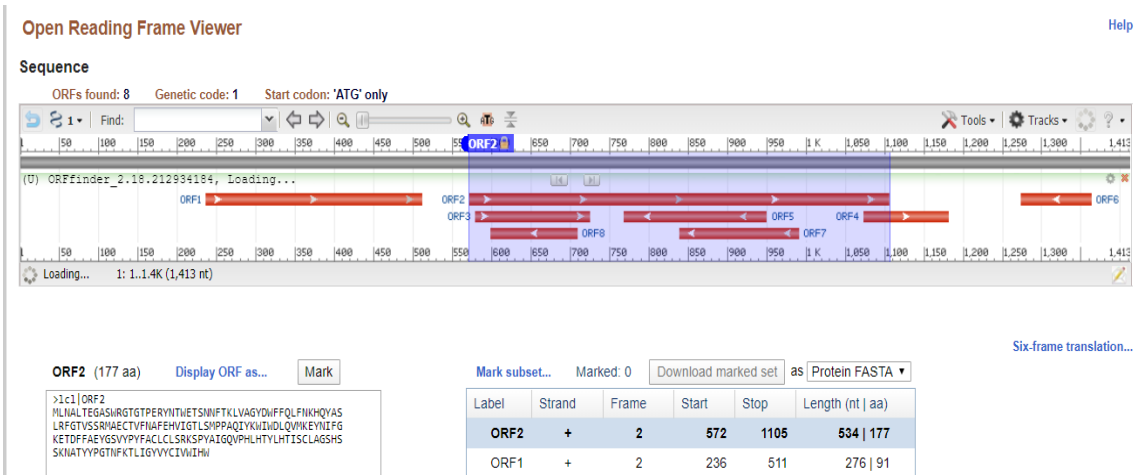
### **LTR\_Finder**

Esta ferramenta foi usada para realizar buscas de transposons no genoma de *L. longipalpis*. Para isso, foram usados os *contigs* onde estão inseridas as NcPs. Disponível online: [http://tlife.fudan.edu.cn/tlife/ltr\\_finder/](http://tlife.fudan.edu.cn/tlife/ltr_finder/)

## **3.17 Produção de peptídeos sintéticos**

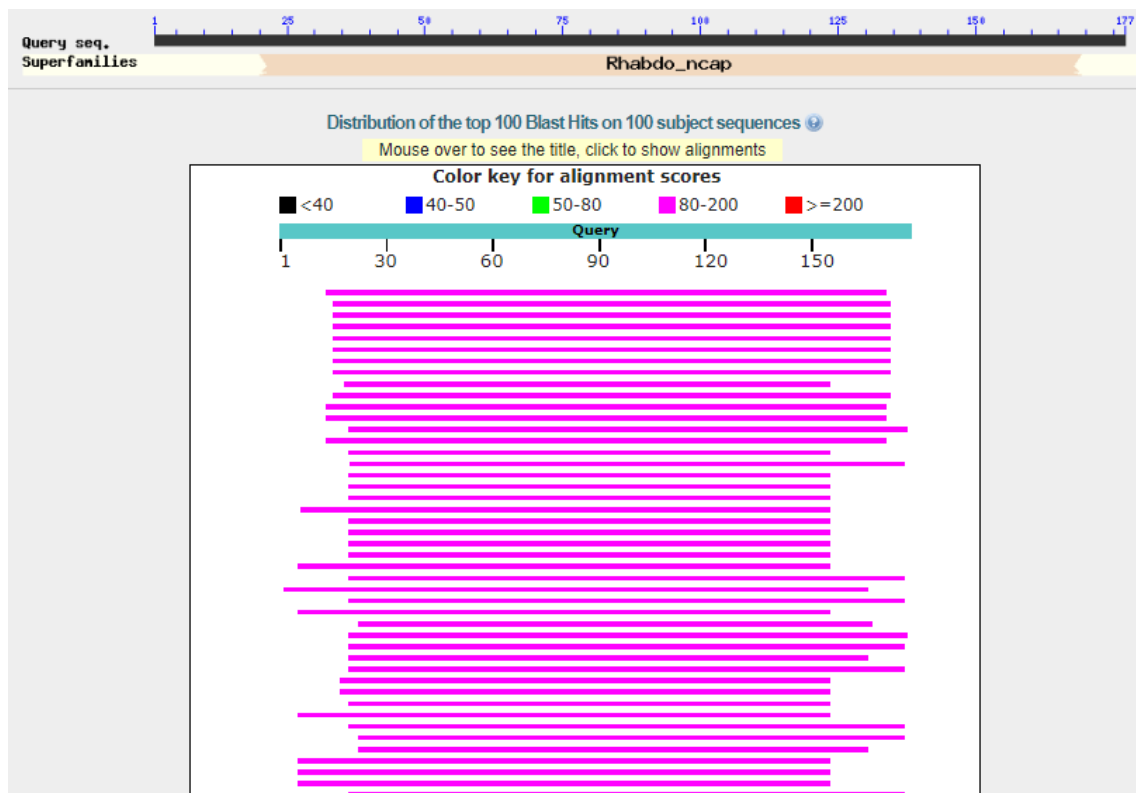
A fim de verificar se a sequência de NcP1, além de transcrita, estava sendo traduzida, peptídeos sintéticos foram produzidos, para serem usados como antígenos em coelhos, para produção de anticorpos anti-NcP1, a serem posteriormente usados em ensaios de western blot.

Os peptídeos a serem inoculados em coelhos foram desenhados através do *software* AbDesigner. A primeira etapa foi a de buscar *Open reading frames* (ORFs) da sequência de interesse, neste caso, NcP1. Para esta análise, foi usada a ferramenta OrfFinder, disponível on-line (**Figura 3.3**).



**Figura 3.3:** Busca de ORFs na sequência de NcP1.1, usando o programa OrfFinder.

Uma das ORFs foi selecionada (neste caso, a ORF 2), porque apresentava uma maior extensão. Após selecioná-la, foi usada a ferramenta BLASTP (realiza a busca de regiões de similaridade entre a sequência da proteína de interesse com sequências de proteínas disponíveis no banco de dados) para confirmar se a ORF escolhida apresentava similaridade com Nucleocapsídeo de Rhabdovírus (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4:** Resultado blastp da ORF2 identificada através do *software* OrfFinder, confirmando a similaridade da mesma com Nucleocapsídeo de Rhabdovírus.

Após essa confirmação, a sequência foi então usada no AbDesigner, que analisou as regiões de maior imunogenicidade e apresentou os peptídeos mais imunogênicos e específicos (**Tabela 3.4**).

**Tabela 3.4:** Peptídeos apresentados pelo *software* AbDesigner após análise de imunogenicidade da sequência de interesse.

<b>Proteína alvo</b>	<b>Sequência do peptídeo</b>	<b>Localização</b>
NcP1	GTGTPERYNTWETSNN	14-28
NcP1	GSHSSKNATYYPGTN	147-161

Os peptídeos foram produzidos pela empresa AminoTech numa escala de síntese de 1 a 4mg.

### **3.18 Inoculação dos peptídeos em coelhos**

Coelhos da raça New Zealand foram submetidos à inoculação subcutânea por três vezes com 1mg de cada peptídeo, com intervalo de 30 dias.

Licença do CEUA: L036/2019.

## IV RESULTADOS

### 4.1 Resultados Prévios de Nucleocapsídeo

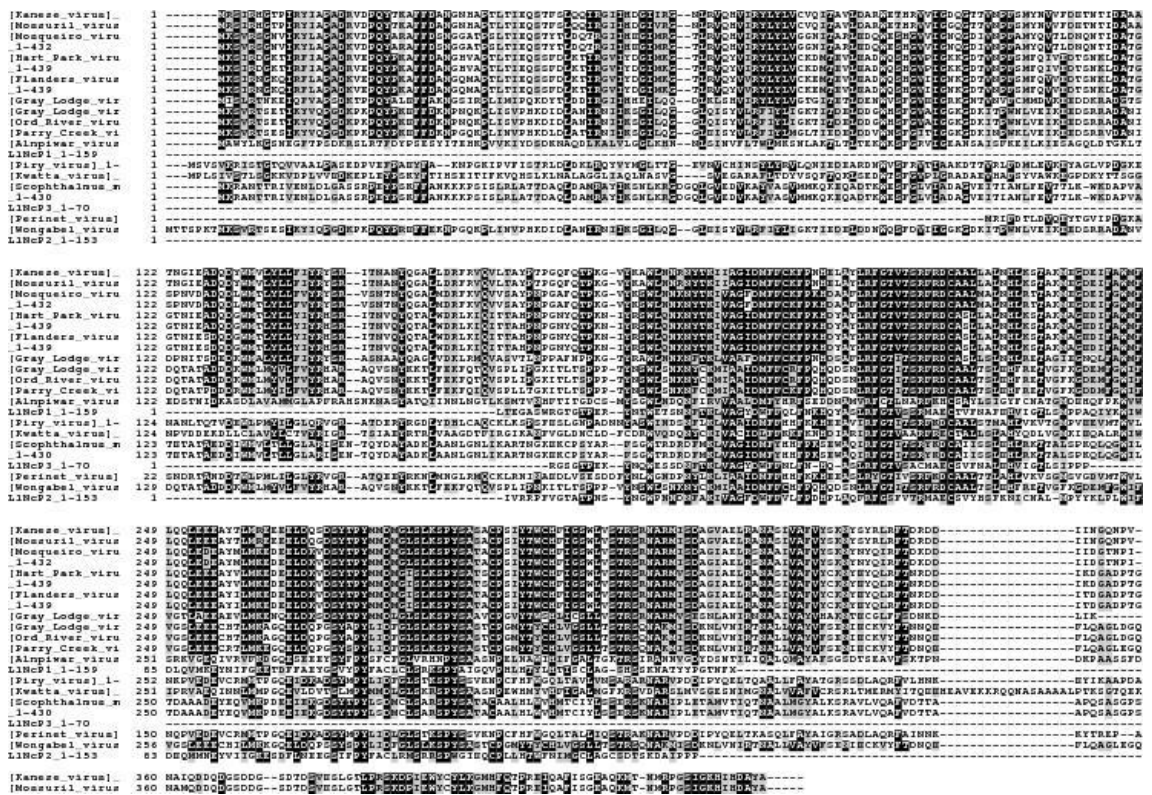
Com a finalidade de identificar possíveis vírus evidenciados por microscopia eletrônica no pellet exosomal de células LL-5, os ácidos nucleicos foram extraídos e sequenciados e, após alinhamentos com banco de dados de vírus, foram identificadas seis sequências parciais codificantes para proteínas de Rhabdovirus, sendo três para proteínas de nucleocapsídeo (denominadas NcP1, NcP2 e NcP3) e três codificantes para uma RNA polimerase dependente de RNA (denominadas Pol1, Pol2 e Pol3) (**Figura 4.1**).

```
(NcP1) 477pb
ACTTACTGAGGGAGCCTCATGGAGAGGC ACTGGAACCCAGACGATACAATACATGGAGACATCTAACAAATTTACAAA GTTGGTGGCCGGA
TATGACTGGTTCTCCAGTTGTTAAACAAACATCAATATGCATCCTTGAGATTCCGAAACCGTTTCATCTCGAATGGCTGAGTGTACAGTCTTCAAT
GCATTTGAACACGTAATAGGAACCCCTGTCGATGCCCCCTGCTCAGATTTACAAGTGGATTTGGGATCTACAGGTGATGAAGGAATACAACATTTT
TGGTAAAGAGACAGACTTCTTCGCAGAAATATGGGCTGTTTTACCCATACTTCGCGTGCCCTCTGTCTTTTCGAGAAAGTCCCCATATGCTATAGGCC
AAGTACCTCATCTCCATACGTATTTGCATACCATTAGTTGCTTAGCAGGAGTCAATTCATCTAAGAACGCGACTTACTACCCGGGACCAACTTC
AA
(NcP2) 459pb
TGGAGGGGGATTGCATCTTTCGAAGTGTGCTGCACCCTGCCAAACACCCCAATTATGTTAAACCAGGTGTGCAAAGGGGGCATTGCTCGATC
CCCCATGGAGATCTCCTTGACATTCGTAGACATGCGAAGTATGGGAATATTGATCCTTCCTCATTAGGAAATCACTTTCTTTCCCTATGATTACG
TATTCATTCATCATCTGCTCATCAAATATCCATAGAGGGA GTTTATAATACGGCATAAAGAGCATTGCAGATATTTTTGAAGCTGTGGTAAACAGA
GCACCTAGCCATCCCGGTTACGAAGCTTCCGAATCTGAACTGTGCCAAAGGGTGATCCGGGAAAA GAACA AAAAACC AAATCAAACCCAGCAAC
GATTTTGGCAAAGTTATCATTGTTTCGGCCAGCCATTGTAGGAGTTTGGGGTTGCTGTACCAACAAATGGGCGCCGCACAAT
(NcP3) 210pb
TGGAGGGGGATTGAGAGGGTTCCAATAACGTGCTCAAGGGCGTTGAACACGGAGCATTCTGCCATGCAAGCTGATACTGTTCCAAATCTTAAT
GAGGCTACTGATGTCAATTGAACAAGTTAAAGAACC AATCGTAACCCGCGACTAATTTGGTAAAGTTGTCCGAAGATTCACCAATTGATTGTATT
CTCAGGAGTTCCCGATCCTCT
(Pol1) 386pb
AATCAAGCCACTCTTCCCCAGATTCCTCAGTGAGTTTAGAGCAGGGACTATTTATGGTGCCGAGATTCACTACTTGGACTGTTTCAAACACTCAC
GAACGATACGTAACCTTTTCAAACACAA AATGGAACGAACAATCGATTTTATAATCTTCAAGTCGGAGATTAGATCTTTGGCAAGTTTGATGGAC
ATTACTGTGAGGTTCCGAGGGC ATATGTGGACATGCTCAAGTTCACATGCCGATTACTTCCGGGCAAAGTCTTGGGGGAAAGAAGTACTGGGAA
CTACAATTCCTCATCCAGCAGAGATGTTTCGGAACAGGAGTCTTGTGTTTTGGAAACTGCCAGAGTGTGATCGTGGTGGATTCAATTACATTTCA
GTGTAT
(Pol2) 250pb
TATCCCGTCTGTAGTTTITAGAAAGTCCGGGCGTCCCAAATAGTAAACGAAGCTTTTTTCGAAGATTTTCATGAGTCTGGCGATGAGATTGGGA
TAACCCAGGAATTGACCCATTACTTTGAAAACCTGGACCA GTTGCTTCTCTCTCTGATGATTGTTCCACTTCTCATAATCTATGTGATTGCTATA
GAGATGGCACGGTAATCATCTAGACCTTGTCCGTTGGTGGTCTCCAACATTTTCTTAAT
(Pol3) 250pb
GTTCTCCGTGATATCTAATGTGTCGATCAACTCTAGATCGGATTTAAACTGGCGAACCTTGTATTGTGTGCAGATCACCTGATTGCCCTTG
TGCTAGTACTTTGACCAATGATTTTCGAATTTTCGATTCCTCATGATAATGAGGAGACTCAAATACTCCACCCTTTTTGAGTCTCCTCATTATC
ATGAGGGAATCGAAAATTCGAAAATACATTGAGTAGAAGTGTTTTAAATCACATTGTTGT
```

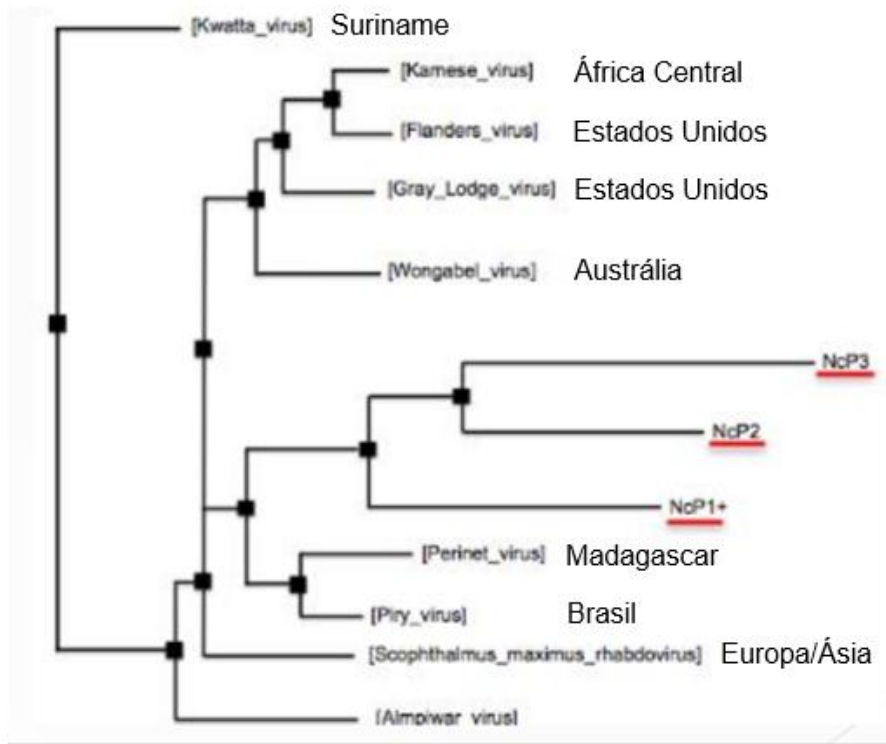
**Figura 4.1:** Sequências de RNAs rhabdovirais identificadas no pellet exosomal de células LL-5.

Inicialmente, as sequências parciais de NcP1, NcP2 e NcP3 foram traduzidas e alinhadas com sequências de proteínas de Nucleocapsídeo de vários Rhabdovirus. O resultado deste alinhamento sugeriu que possivelmente todas se tratavam de sequências de Nucleocapsídeo de um mesmo Rhabdovirus, já que elas alinhavam numa mesma região. Também foi realizada análise filogenética dessas sequências (**Figura 4.3**). Nota-se que as sequências apresentam diferentes graus de parentesco entre si. As sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 apresentam similaridades e advêm de um ancestral em

comum mais distante, enquanto NcP2 e NcP3 possuem ancestral em comum mais recente.



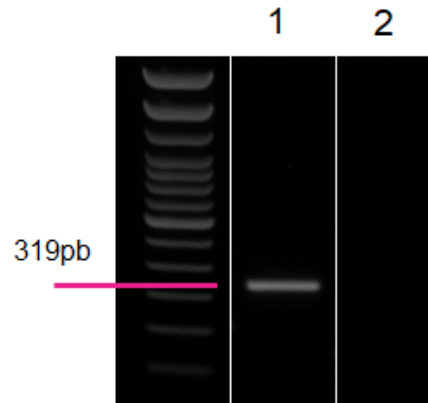
**Figura 4.2:** Alinhamento das seqüências NcP1, NcP2 e NcP3 com proteínas de Nucleocapsídeo de Rhabdovírus.



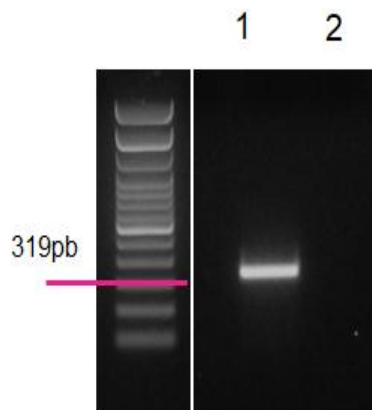
**Figura 4.3:** Árvore filogenética com as sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 e sequências de Nucleocapsídeo de outros Rhabdovirus.

A partir da identificação dessas sequências, se iniciou a caracterização *in vitro* das mesmas. Para isso, foram usadas amostras de células LL-5. Oligonucleotídeos foram desenhados para as três sequências (NcP1, NcP2 e NcP3).

Após a extração de RNA dessas células e a síntese do DNA complementar (cDNA), estas amostras foram usadas em PCR (**Figura 4.4**). Por se tratar de um vírus não retroviral que possui como material genético o ácido ribonucleico (RNA), era esperado que houvesse essa identificação em amostras de cDNA. O DNA dessas células também foi extraído e usado como controle negativo dessas reações. Como esses vírus nunca apresentam DNA como material genético, não seria esperada nenhuma amplificação com os oligonucleotídeos utilizados na amostra do controle negativo.



**Figura 4.4:** Amplificação de NCP1 a partir de cDNA de células LL-5: 1) cDNA LL-5; 2) Controle negativo do oligonucleotídeo NcP1.



**Figura 4.5:** Amplificação de NCP1 a partir de DNA de células LL-5: 1) DNA LL-5; 2) Controle negativo.

Como vemos na **Figura 4.5** houve amplificação de NCP1 na amostra de DNA de LL-5, o que foi inesperado, uma vez que vírus de RNAs não-retrovirais não se apresentam sob forma de DNA em nenhuma etapa do seu ciclo replicativo. Este resultado sugeriu a presença de inserção rhabdoviral no genoma dessas células e, uma vez que o gene era também amplificado a partir do cDNA, esse fragmento era transcrito. Estes resultados ainda não incluem NcP2 e NcP3.

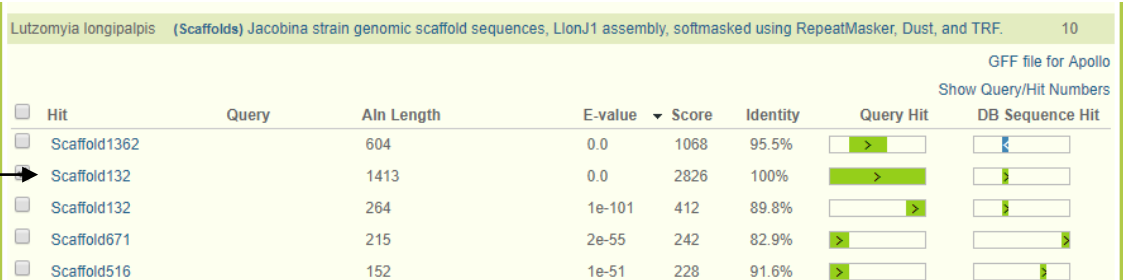


## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Análises *in silico* das sequências de Nucleocapsídeo

Algumas análises *in silico* das três sequências (NcP1, NcP2 e NcP3) foram realizadas, de forma a ampliar a caracterização dessas inserções. Porém, a única fonte de material genético anotado no banco de dados *VectorBase*, é o genoma de *Lutzomyia longipalpis* proveniente de Jacobina (Bahia).

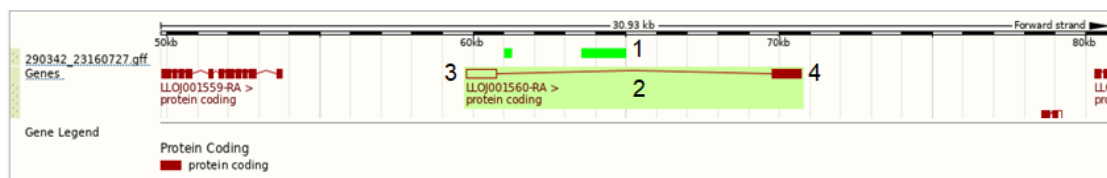
A sequência de NcP1 foi identificada no *scaffold132* do genoma de *L. longipalpis*. Esta sequência era maior do que a que havia sido sequenciada a partir do pellet exosomal do sobrenadante das células LL-5 e apresentava um *hit* de 100% (**Figura 4.6**). Esta sequência maior foi denominada NcP1.1.



Hit	Query	Aln Length	E-value	Score	Identity	Query Hit	DB Sequence Hit
<input type="checkbox"/>	Scaffold1362	604	0.0	1068	95.5%	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Scaffold132	1413	0.0	2826	100%	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Scaffold132	264	1e-101	412	89.8%	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Scaffold671	215	2e-55	242	82.9%	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Scaffold516	152	1e-51	228	91.6%	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

**Figura 4.6:** Presença de NcP1.1 no *scaffold132* de *L. longipalpis* Jacobina com *hit* de 100%.

Ao ampliar a visualização desta sequência, foi possível identificar a região gênica onde NcP1.1 está inserida. Está localizada num íntron de um gene de AcetilCoA sintetase, como mostra a figura 4.7.



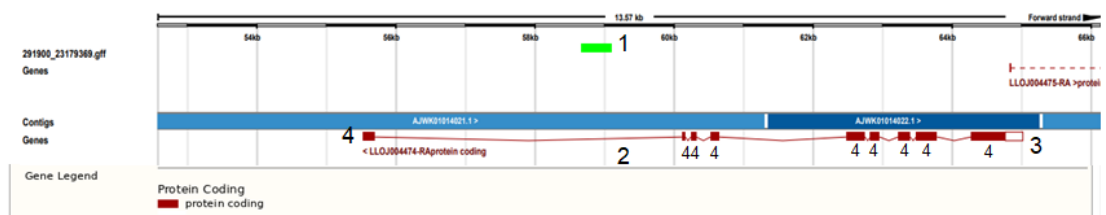
**Figura 4.7:** 1) NcP1.1; 2) íntron do gene AcetilCoA, no qual NcP1.1 está inserido. 3) Região promotora de AcetilCoA e 4) Região codificante do gene.

Já a sequência NcP2, está localizada em um trecho do *scaffold264*. Desta vez, com *hit* de 97,5%.

Hit	Query	Aln Length	E-value	Score	Identity	Query Hit	DB Sequence Hit
Scaffold264	NcP2	437	0.0	818	97.5%	>	>
Scaffold182	NcP2	23	0.38	40	95.7%	>	<
Scaffold182	NcP2	23	0.38	40	95.7%	>	<
Scaffold529	NcP2	19	1.3	38	100%	>	>
Scaffold1061	NcP2	27	1.3	38	88.9%	>	>
Scaffold333	NcP2	23	4.6	36	91.3%	>	>
Scaffold830	NcP2	21	4.6	36	95.2%	>	>
Scaffold830	NcP2	21	4.6	36	95.2%	>	>
Scaffold1128	NcP2	21	4.6	36	95.2%	>	>
Scaffold5803	NcP2	23	4.6	36	91.3%	>	<

**Figura 4.8:** Presença de NcP2 no *scaffold264* de *L. longipalpis* Jacobina com *hit* de 100%.

Está localizada no íntron do gene HRP65 (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9:** 1) NcP2; 2) íntron do gene HPR65, no qual NcP12 está inserido. 3) Região promotora do gene e 4) Éxons do gene.

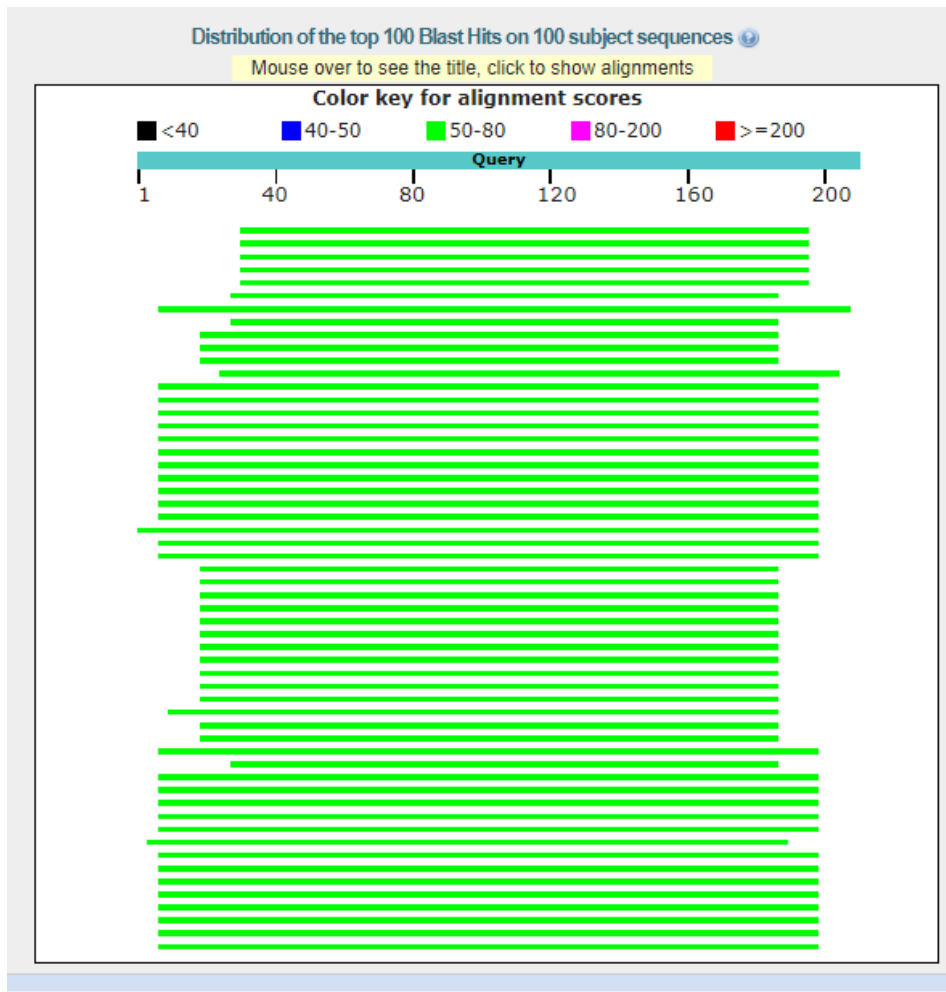
A sequência NcP3, é de apenas 210 pares de base e os hits apresentaram *e-value* muito alto (**Figura 4.10**). Este valor é o significado estatístico do alinhamento e é dependente do tamanho da sequência consultada. Quanto menor for este valor (mais próximo de zero), mais significativa será a análise. Portanto, mais análises podem ser necessárias para conseguir compreender onde este gene está inserido no genoma, uma vez que através das ferramentas usadas, não foi possível precisar a localização de NcP3 no genoma de *L. longipalpis*.

Hit	Query	Aln Length	E-value	Score	Identity	Query Hit	DB Sequence Hit
AJWK01030996.1	NcP3	22	0.52	38	95.5%		
AJWK01016184.1	NcP3	28	1.8	36	85.7%		
AJWK01020126.1	NcP3	21	1.8	36	95.2%		
AJWK01014049.1	NcP3	42	1.8	36	78.6%		
AJWK01009296.1	NcP3	23	1.8	36	95.7%		
AJWK01004387.1	NcP3	18	1.8	36	100%		
AJWK01021378.1	NcP3	22	6.3	34	90.9%		
AJWK01027130.1	NcP3	37	6.3	34	78.4%		
AJWK01034131.1	NcP3	17	6.3	34	100%		
AJWK01017405.1	NcP3	22	6.3	34	90.9%		

*omyia longipalpis* (Scaffolds) Jacobina strain genomic scaffold sequences, LionJ1 assembly, softmasked using RepeatMasker, Dust, and TRF. 10

[GFF file for Apollo](#)

Hit	Query	Aln Length	E-value	Score	Identity	Query Hit	DB Sequence Hit
Scaffold8	NcP3	22	0.56	38	95.5%		
Scaffold180	NcP3	23	2.0	36	95.7%		
Scaffold317	NcP3	28	2.0	36	85.7%		
Scaffold426	NcP3	21	2.0	36	95.2%		
Scaffold1220	NcP3	18	2.0	36	100%		
Scaffold2647	NcP3	42	2.0	36	78.6%		
Scaffold3317	NcP3	22	6.8	34	90.9%		
Scaffold4653	NcP3	22	6.8	34	90.9%		
Scaffold6565	NcP3	37	6.8	34	78.4%		
Scaffold9281	NcP3	17	6.8	34	100%		



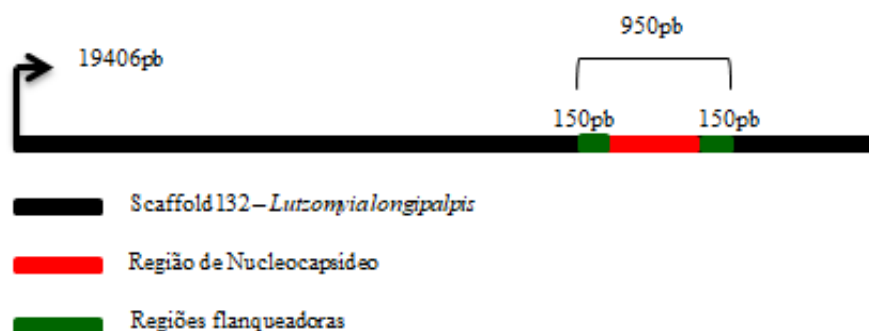
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<a href="#">Parry Creek virus nucleoprotein, phosphoprotein, hypothetical proteins, matrix, glycoprotein, hypothetical protein, and</a>	64.3	64.3	78%	1e-07	43.64%
<a href="#">Ord River virus isolate OR1023, complete genome</a>	62.9	62.9	78%	3e-07	41.82%
<a href="#">Ord River virus nucleoprotein, hypothetical protein, phosphoprotein, hypothetical proteins, matrix, glycoprotein, hyp</a>	62.9	62.9	78%	3e-07	41.82%
<a href="#">Holmes Jungle virus isolate DPP1163, complete genome</a>	62.0	62.0	78%	5e-07	41.82%
<a href="#">Wongabel virus strain CS264, complete genome</a>	62.0	62.0	78%	5e-07	41.82%
<a href="#">Mosqueiro virus nucleoprotein, phosphoprotein, hypothetical proteins, matrix, glycoprotein, hypothetical protein, an</a>	61.1	61.1	75%	9e-07	45.28%
<a href="#">Piry virus strain BeAn2423, complete genome</a>	60.6	60.6	95%	1e-06	32.84%
<a href="#">Sweetwater Branch virus nucleoprotein, phosphoprotein, matrix, hypothetical proteins, glycoprotein, hypothetical p</a>	59.7	59.7	75%	2e-06	39.62%
<a href="#">Mossuril virus nucleoprotein, phosphoprotein, hypothetical proteins, matrix, glycoprotein, hypothetical protein, and</a>	59.3	59.3	80%	3e-06	42.86%
<a href="#">Kamese virus strain ArB 9074, complete genome</a>	59.3	59.3	80%	3e-06	42.86%
<a href="#">Kamese virus nucleoprotein, phosphoprotein, hypothetical proteins, matrix, glycoprotein, hypothetical protein, and</a>	59.3	59.3	80%	3e-06	42.86%
<a href="#">Perinet virus, complete genome</a>	59.3	59.3	85%	3e-06	36.67%
<a href="#">Chandipura virus isolate ArD129179, partial genome</a>	58.8	58.8	91%	4e-06	34.38%

**Figura 4.10:** Análises *in silico* da sequência de NcP3

Essas análises confirmaram a presença dos EREs codificantes para Nucleocapsídeo (NcP1 e NcP2) no genoma de *L. longipalpis* e identificaram os genes onde estão inseridas essas sequências rhabdovirais, permitindo

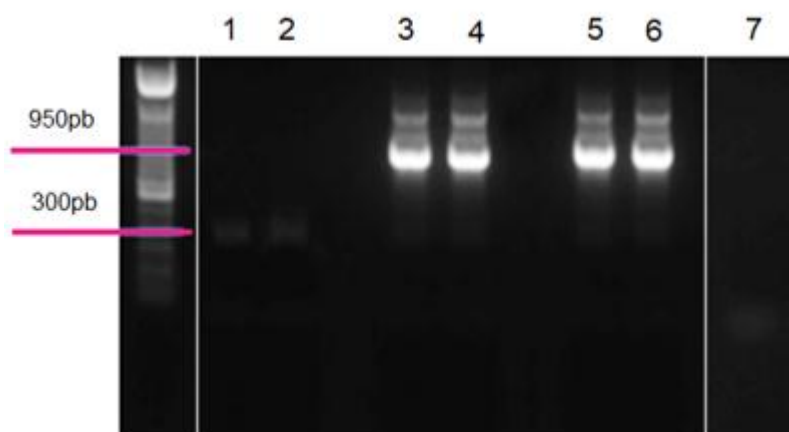
delimitar as regiões flanqueadoras, e assim identificar a real extensão dos mesmos.

Por questões técnicas e de disponibilidade de tempo, nossos estudos mais detalhados se concentraram na sequência NcP1. Para confirmar experimentalmente a presença de NcP1.1 no genoma, novos oligonucleotídeos (NcP1.1 F e NcP1.1 R) foram desenhados para essa região, mas com um acréscimo de 150 pares de base à montante e à jusante da mesma, correspondente às regiões flanqueadoras. Portanto, no caso de haver inserção no genoma esperava-se a amplificação de uma banda de 950 pares de base. A amplificação de 300 pares de base indicaria ausência de inserção (esquematizado na **Figura 4.11**).



**Figura 4.11:** Esquema representativo região de NcP1.1 no genoma de *L. longipalpis*.

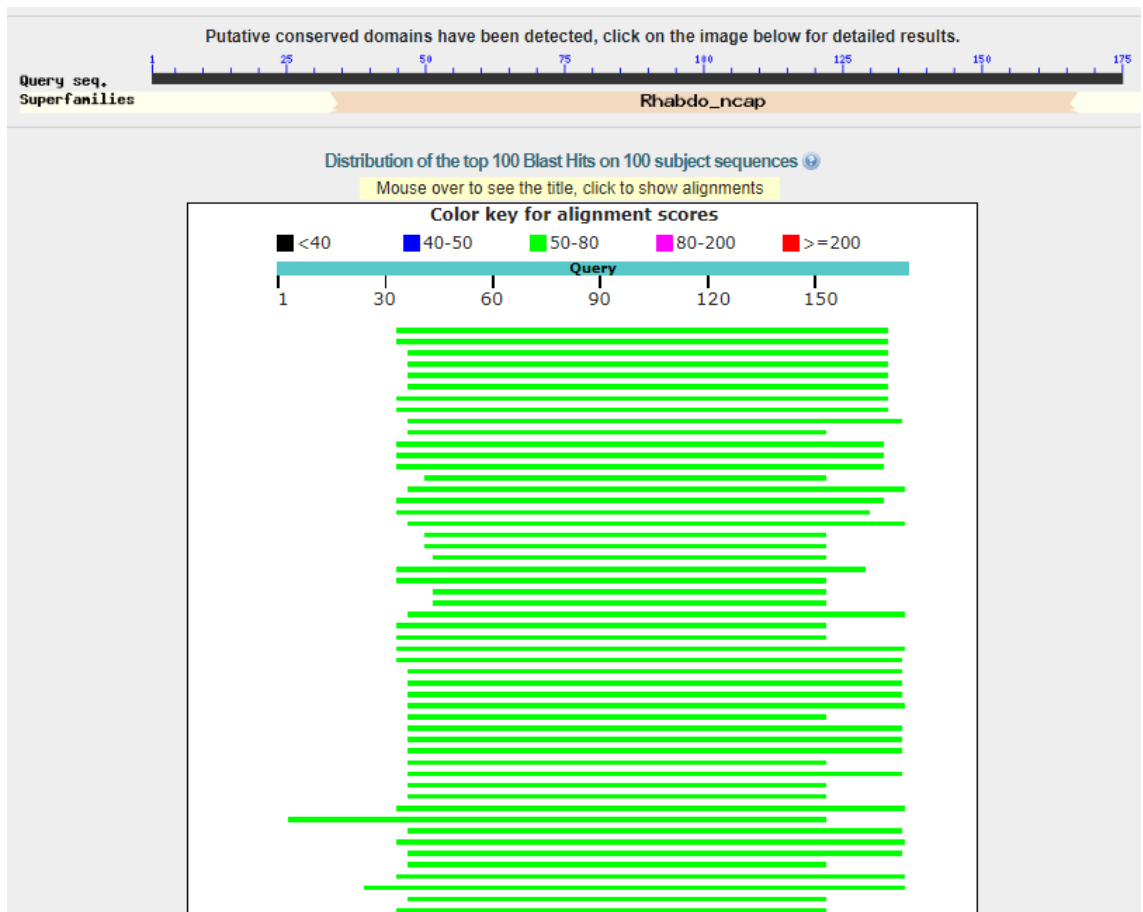
A **Figura 4.12**. mostra o resultado da PCR para investigar a presença ou não da inserção de NcP1.1 no genoma.



**Figura 4.12:** Gel representativo de PCR com oligonucleotídeos para sequência de NcP1.1: 1 e 2) *L. longipalpis* (Santarém); 3 e 4) *L. longipalpis* (Serra da Tiririca); 5 e 6) *L. longipalpis* (Jacobina); e 7) Controle negativo.

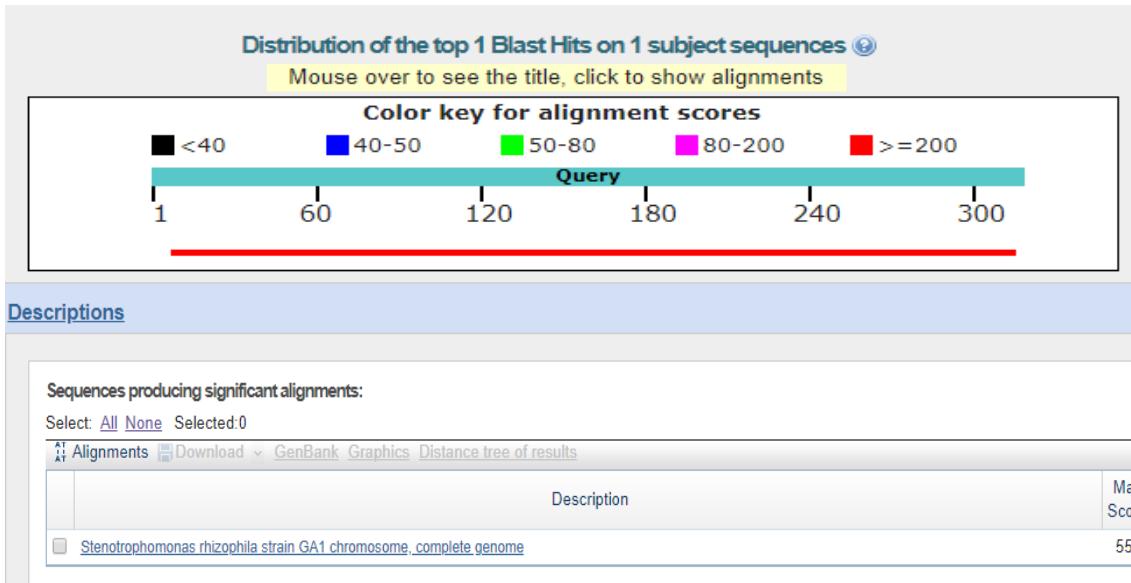
É possível observar que a população de Santarém (Pará) (sabidamente sem a inserção, ver Fig.4.19) apresentou amplificação de 300 pares de base, o que corresponde às regiões flanqueadoras, enquanto as populações de Jacobina e Serra da Tiririca (sabidamente positivas, ver Fig. 4.19) apresentaram amplificações de 950 pares de base, já que possuem inserção de NcP1.1 no genoma. Para validar esses resultados, as bandas foram clonadas e sequenciadas.

As bandas da amostra de *L. longipalpis* de Serra da Tiririca, ao serem alinhadas com uso da ferramenta BLASTp (NCBI), apresentaram similaridade com Nucleocapsídeo de Rhabdovírus (**Figura 4.13**).



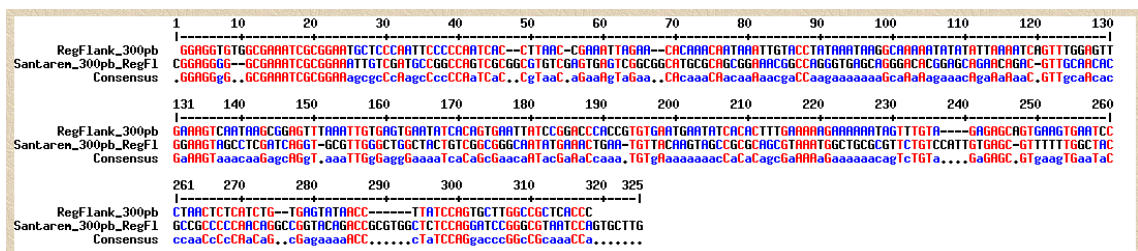
**Figura 4.13:** Análise *in silico* banda de 950 pares de base amostra de *L. longipalpis* de Serra da Tiririca (Rio de Janeiro), referente à inserção de NcP1.1 no genoma.

Porém, a banda de *L. longipalpis* de Santarém (300pb = região flanqueadora), não apontou nenhuma similaridade quando alinhada com o genoma de *L. longipalpis*, sugerindo que o fragmento amplificado e sequenciado era apenas um artefato (**Figura 4.14**).



**Figura 4.14:** Análises *in silico* da banda de 300 pares de base da amostra de *L. longipalpis* de Santarém (Pará), referente às regiões flanqueadoras.

Para confirmar que a sequência de 300 pares de base amplificada e sequenciada a partir da amostra de *L. longipalpis* de Santarém (Pará) era um artefato, a mesma foi alinhada com a sequência das regiões flanqueadoras no genoma de *L. longipalpis* (**Figura 4.15**), com uso da ferramenta MultAlin (Multiple sequence alignment with hierarchical clustering) de F. CORPET, 1988.



**Figura 4.15:** Alinhamento da banda de 300 pares de base da amostra de *L. longipalpis* de Santarém (Pará) com as regiões flanqueadoras de *L. longipalpis*. Em vermelho, os nucleotídeos iguais e em azul, os que são diferentes nas duas sequências.

O alinhamento mostrou que as sequências não eram idênticas.

Alguns vírus utilizam o mecanismo de transposição para se mover dentro das células hospedeiras e assim, conseguem integrar parte do seu genoma no genoma do hospedeiro. Portanto, para entender como possivelmente essas sequências podem ter sido inseridas no genoma, foi



realizada uma busca inicial por retrotransposons, usando a ferramenta LTR\_FINDER. As sequências completas dos *scaffolds* identificados anteriormente foram usadas nas análises (**Figuras 4.16 e 4.17**).

```
Program      : LTR_FINDER
Version      : 1.07

Load tRNA db [tRNAdb/Agamb-tRNAs.fa] 0.003 second
Predict protein Domains 0.011 second
>Sequence: Scaffold132 Len:10926
No LTR Retrotransposons Found
```

**Figura 4.16:** Resultado gerado pela ferramenta LTR-FINDER na busca de retrotransposons na sequência *scaffold132* de *L. longipalpis*, que contém a sequência NcP1.1

---

```
Program      : LTR_FINDER
Version      : 1.07

Load tRNA db [tRNAdb/Agamb-tRNAs.fa] 0.003 second
Predict protein Domains 0.000 second
>Sequence: Scaffold264 Len:9496
No LTR Retrotransposons Found
```

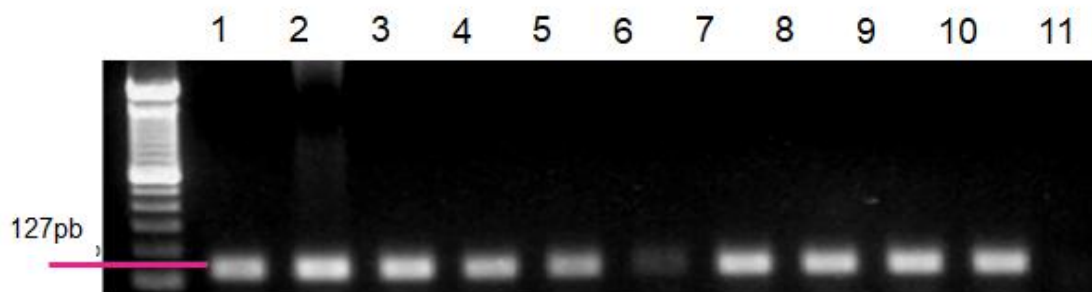
**Figura 4.17:** Resultado gerado pela ferramenta LTR-FINDER na busca de retrotransposons na sequência *scaffold264* de *L. longipalpis* que contém a sequência NcP2.

Essas análises foram negativas, dando a entender que não há a presença desses elementos retrotransposomais no genoma de *L. longipalpis*, que possam justificar a localização dessas sequências rhabdovirais.

#### **4.2.2 Presença de NcP1, NcP2 e NcP3 inseridas no genoma de diferentes flebotomíneos**

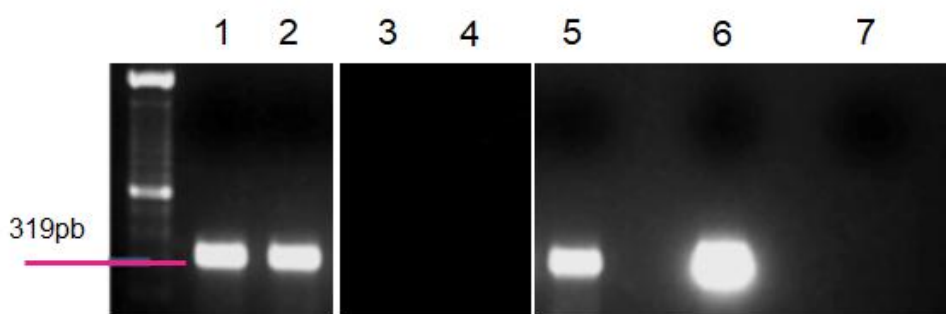
Para estudar a possível manutenção destes EREs ao longo da evolução de flebotomíneos, foram recebidos ao longo do projeto exemplares de diversas populações e espécies de diferentes regiões (ver figura 4.22 e tabela 4.1 dos resultados). Foram realizadas extrações de RNA, síntese de cDNA e extração de DNA. Para comprovar a qualidade das amostras, todas foram amplificadas

com uso de oligonucleotídeos desenhados para o gene constitutivo Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (**Figura 4.18**).

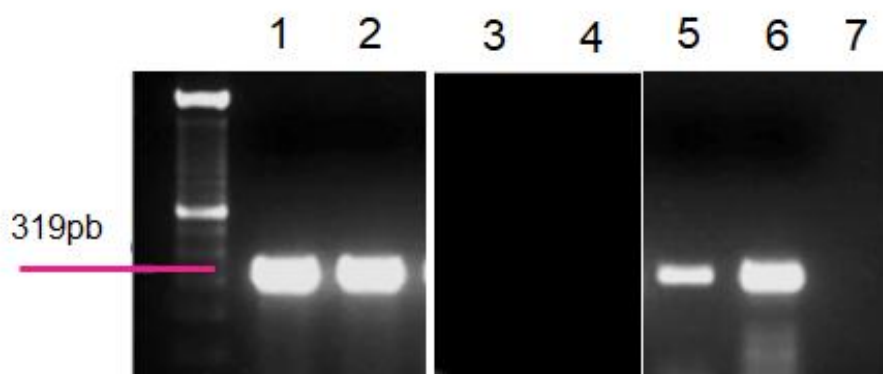


**Figura 4.18:** Gel representativo, mostrando amplificação de GAPDH em diferentes amostras de flebotomíneos do Novo Mundo, de forma a testar a qualidade das mesmas. 1) Células LL-5; 2) Células Lulo; 3) *L. longipalpis* (Santarém) ♀; 4) *L. longipalpis* (Santarém) ♂; 5) *L. migonei* (Baturité) ♀; 6) *L. migonei* (Baturité) ♂; 7) *L. longipalpis* (Serra da Tiririca) ♀; 8) *L. longipalpis*

A grande maioria das amostras analisadas apresentaram inserção genômica de NcP1 e, também apresentaram transcritos referentes a essa inserção. Como esperado, na ausência de inserção não havia transcritos. Algumas dessas amostras estão representadas nas figuras 4.19 e 4.20 abaixo:



**Figura 4.19:** Gel representativo, mostrando a amplificação de NcP1 em diferentes amostras de DNA de flebotomíneos. Algumas amostras possuem inserção no genoma e outras não. 1) Célula LL-5; 2) Célula Lulo; 3) *L. longipalpis* (Santarém) 4) *L. migonei* (Baturité); 5) *L. longipalpis* (Serra da Tiririca); 6) *L. longipalpis* (Jacobina) e 7) Controle negativo.



**Figura 4.20:** Gel representativo, mostrando a amplificação de NcP1 em diferentes amostras de cDNA de flebotomíneos. 1) Célula LL-5; 2) Célula Lulo; 3) *L. longipalpis* (Santarém) 4) *L. migonei* (Baturité); 5) *L. longipalpis* (Serra da Tiririca); 6) *L. longipalpis* (Jacobina) e 7) Controle negativo.

Todas as amostras analisadas até o momento estão na tabela 4.1, a seguir.

**Tabela 4.1:** Amostras de flebotomíneos do Novo Mundo investigadas no projeto.

<b>Espécies</b>	<b>Local</b>	<b>Estado/País</b>
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Santarém	Pará
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Cametá	Pará
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Palmas	Tocantins
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Jacobina	Bahia
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Cavungé	Bahia
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Jequié	Bahia
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Olindina	Bahia
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	X	Piauí
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Bela Vista	Piauí
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Itamaracá	Pernambuco
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Sobral	Ceará

<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Juazeiro do Norte	Ceará
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Nísia Floresta	Rio Grande do Norte
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Estrela das Alagoas	Alagoas
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Campo Grande	Mato Grosso
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Campo Grande	Mato Grosso
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	S. da Tiririca	Rio de Janeiro
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Pancas	Espírito Santo
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Lapinha	Minas Gerais
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Manacapuru	Amazonas
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Rio Preto da Eva	Amazonas
<i>Lutzomyia rorotaensis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia reducta</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia sp.</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia anduzei</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia sericea</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas
<i>Lutzomyia choti</i>	Paudalho	Pernambuco

<i>Lutzomyia longispina</i>	Paudalho	Pernambuco
<i>Lutzomyia wellcomei</i>	Paudalho	Pernambuco
<i>Lutzomyia complexa</i>	Vicência	Pernambuco
<i>Lutzomyia evandroi</i>	Vicência	Pernambuco
<i>Lutzomyia lenti</i>	Passira	Pernambuco
<i>Lutzomyia migonei</i>	S. Vicente Férrer	Pernambuco
<i>Lutzomyia whitmani</i>	Amaraji	Pernambuco
<i>Lutzomyia migonei</i>	Baturité	Ceará
<i>Lutzomyia cruzi</i>	Corumbá	Mato Grosso
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	S. da Tiririca	Rio de Janeiro
<i>Lutzomyia edwardesi</i>	Frei Bruno	Santa Catarina
<i>Lutzomyia edwardesi</i>	Herval d'Oeste	Santa Catarina
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Herval d'Oeste	Santa Catarina
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Herval Velho	Santa Catarina
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Brisas do Vale	Santa Catarina
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Frei Bruno	Santa Catarina
<i>Psatiromyia lanei</i>	Lacerdópolis	Santa Catarina
<i>Psatiromyia lanei</i>	UNOESC	Santa Catarina
<i>Martinsmyia alphabetica</i>	Lacerdópolis	Santa Catarina
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Puerto Iguazú	Argentina
<i>Lutzomyia whitmani</i>	Puerto Iguazú	Argentina
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Bogotá	Colômbia



**Figura 4.21:** Mapa ilustrando locais de obtenção dos flebotomíneos usados no projeto

Foi observado que algumas populações de uma mesma espécie, mas de locais distintos, compartilhavam a mesma inserção no genoma, e outras não. Até o momento, somente a população de *L. longipalpis* de Santarém (Pará), não apresentou inserção de NcP1, enquanto *L. longipalpis* coletados em Cametá (Pará), Palmas (Tocantins), Jacobina (Bahia), Cavungé (Bahia), Jequié (Bahia), Olindina (Bahia), Bela Vista (Piauí), Itamaracá (Pernambuco), Sobral (Ceará), Nísia Floresta (Rio Grande do Norte), Estrela das Alagoas (Alagoas), Campo Grande (Mato Grosso), Serra da Tiririca (Rio de Janeiro), Pancas e Lapinha (Minas Gerais) apresentavam inserção de NcP1. O mesmo foi observado em amostras de *L. umbratilis* de Manacapuru e Rio Preto da Eva (Amazonas), que se localizam ao Sul e ao Norte do Rio Negro, respectivamente. *L. umbratilis* é vetor de leishmaniose no Norte da América do

Sul, cujo agente etiológico é *Leishmania guyanensis*. A região Norte de Manaus é endêmica para leishmaniose e a população de *L. umbratilis* da região Sul de Manaus é refratária à infecção por leishmania (Soares, R.P et. al, 2018). A população de Manacapuru apresentou inserção de NcP1 e a de Rio Preto da Eva não.

Curiosamente, nenhuma das demais amostras recebidas do estado do Amazonas, as quais vieram de populações de *Lutzomyia rorotaensis*, *Lutzomyia reducta*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia davis*, *Lutzomyia ubiquitous*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia sericea*, apresentaram inserção de NcP1. Já as amostras de *Lutzomyia davis* provenientes de Rondônia, mas de diferentes regiões (Potosi, Santa Maria, Cachoeira e Barragem), todas apresentaram inserção de NcP1. No estado de Pernambuco foi investigada inserção de NcP1 com as amostras de *Lutzomyia choti*, *Lutzomyia longispina*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia complexa*, *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia lenti*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia whitmani*. Dessas populações, somente *Lutzomyia choti* e *Lutzomyia whitmani* apresentaram inserção de NcP1. A maioria das amostras de Santa Catarina apresentaram inserção no genoma. Curiosamente, em relação a *Psatromyia lanei* e *Martinsmyia alfabética*, ambas de Lacerdópolis, a primeira apresentou inserção no genoma e a segunda não.

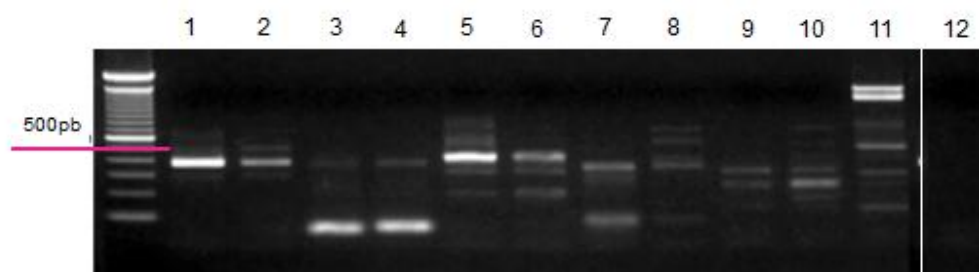
Porém, apenas quatro amostras, até o momento, não apresentaram transcritos, mesmo apresentando inserção de NcP1. São populações de *L. umbratilis* de Manacapuru (Amazonas), *L. choti* de Paudalho (Pernambuco), *L. whitmani* de Amaraji (Pernambuco) e *L. longipalpis* de Puerto Iguazú (Argentina).

Também recebemos, através de colaborações, amostras de células embrionárias e flebotômíneos do Velho Mundo (**Tabela 5**).

**Tabela 4.2:** Amostras de flebotomíneos do Velho Mundo, provenientes do insetário da Charles University (República Tcheca), investigadas no projeto.

Espécies	Proveniência
<i>Phlebotomus arabis</i>	República Tcheca (Insetário)
<i>Phlebotomus argentipes</i>	República Tcheca (Insetário)
<i>Phlebotomus papatasi</i>	República Tcheca (Insetário)
<i>Phlebotomus sergenti</i>	República Tcheca (Insetário)
<i>Sergentomyia schwetzi</i>	República Tcheca (Insetário)

Todas as amostras foram inicialmente submetidas a uma reação de PCR com uso de oligonucleotídeos para o gene constitutivo Histona (**Figura 4.22**).

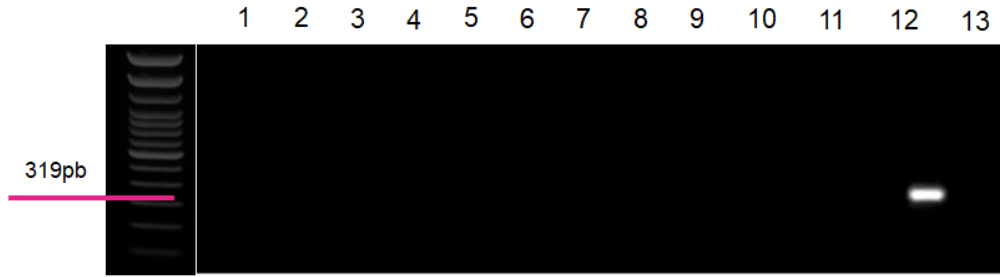


**Figura 4.22:** Amplificação da sequência de Histona em diferentes amostras de flebotomíneos do Velho Mundo. 1) Célula embrionária de *P. papatasi* PP-9; 2) *P. arabis* ♀; 3) *P. arabis* ♂; 4) *P. argentipes* ♀; 5) *P. argentipes* ♂; 6) *P. papatasi* ♀; 7) *P. papatasi* ♂; 8) *P. sergenti* ♀; 9) *P. sergenti* ♂; 10) *S. schwetzi* ♀; 11) *S. schwetzi* ♂; 12) Controle negativo.

Este oligonucleotídeo foi desenhado para amostras de *L. longipalpis*, e a falta de especificidade possivelmente explicaria o porquê de cada amplificação ter apresentado diversas bandas.

Através de PCR, foi possível observar que em nenhuma das amostras do Velho Mundo foi identificada a inserção de NcP1 (**Figura 4.23**) e tampouco sua transcrição.





**Figura 4.23:** Amplificação de NcP1 em diferentes amostras de DNA de flebotomíneos do Velho Mundo. 1) Célula embrionária de *P. papatasi* PP-9; 2) *P. arabicus* ♀; 3) *P. arabicus* ♂; 4) *P. argentipes* ♀; 5) *P. argentipes* ♂; 6) *P. papatasi* ♀; 7) *P. papatasi* ♂; 8) *P. sergenti* ♀; 9) *P. sergenti* ♂; 10) *S. schwetzi* ♀; 11) *S. schwetzi* ♂; 12) LL-5 e 13) Controle negativo.

Todos os resultados apresentados acima referentes à NcP1 em flebotomíneos do Velho e Novo Mundo estão resumidos na **Tabela 4.3** abaixo:

**Tabela 4.3:** Resultado inserção e transcritos de NcP1 em amostras de flebotomíneos do Novo Mundo.

Espécies	Local	Estado/País	DNA	cDNA
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Santarém	Pará		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Cametá	Pará		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Palmas	Tocantins		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Jacobina	Bahia		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Cavungé	Bahia		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Jequié	Bahia		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Olindina	Bahia		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	X	Piauí		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Bela Vista	Piauí		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Itamaracá	Pernambuco		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Sobral	Ceará		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Juazeiro do Norte	Ceará	ND	

<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Nízia Floresta	Rio G. do Norte		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Estrela das Alagoas	Alagoas		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Campo Grande	Mato Grosso		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Campo Grande	Mato Grosso		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	S. da Tiririca	Rio de Janeiro		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Pancas	Espírito Santo		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Lapinha	Minas Gerais		
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Manacapuru	Amazonas		
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Rio Preto da Eva	Amazonas		
<i>Lutzomyia rorotaensis</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia reducta</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia sp.</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia davis</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia anduzei</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia sericea</i>	Manaus	Amazonas		
<i>Lutzomyia davis</i>	Potosi	Rondônia		
<i>Lutzomyia davis</i>	Santa Maria	Rondônia		
<i>Lutzomyia davis</i>	Cachoeira	Rondônia		
<i>Lutzomyia davis</i>	Barragem	Rondônia		
<i>Lutzomyia choti</i>	Paudalho	Pernambuco		
<i>Lutzomyia longispina</i>	Paudalho	Pernambuco		
<i>Lutzomyia wellcomei</i>	Paudalho	Pernambuco		

<i>Lutzomyia complexa</i>	Vicência	Pernambuco		
<i>Lutzomyia evandroi</i>	Vicência	Pernambuco		
<i>Lutzomyia lenti</i>	Passira	Pernambuco		
<i>Lutzomyia migonei</i>	S. Vicente Férrer	Pernambuco		
<i>Lutzomyia whitmani</i>	Amaraji	Pernambuco		
<i>Migonemyia migonei</i>	Baturité	Ceará		
<i>Lutzomyia cruzi</i>	Corumbá	Mato Grosso		ND
<i>Lutzomyia tupynambai</i>	S. da Tiririca	Rio de Janeiro	ND	
<i>Lutzomyia edwardesi</i>	Frei Bruno	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia edwardesi</i>	Herval d'Oeste	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Herval d'Oeste	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Herval Velho	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Brisas do Vale	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia fischeri</i>	Frei Bruno	Santa Catarina		ND
<i>Psatiromyia lanei</i>	Lacerdópolis	Santa Catarina		ND
<i>Psatiromyia lanei</i>	UNOESC	Santa Catarina		ND
<i>Martinsmyia alphabetica</i>	Lacerdópolis	Santa Catarina		ND
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Puerto Iguazú	Argentina		
<i>Lutzomyia whitmani</i>	Puerto Iguazú	Argentina		
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Bogotá	Colômbia		

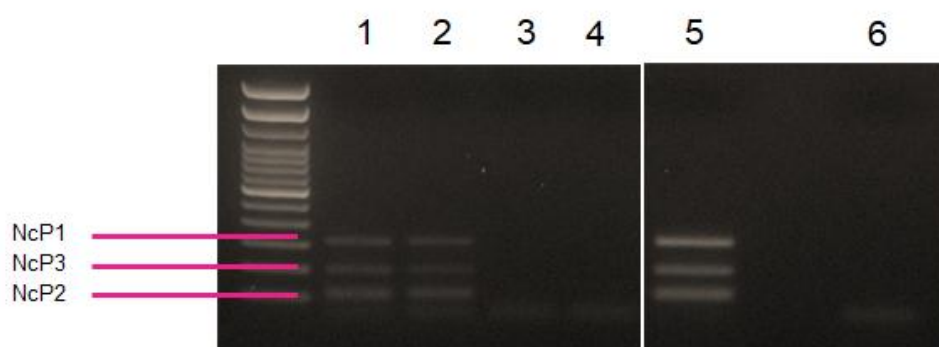
Em verde: positivo para inserção/transcrição de NcP1;

Em vermelho: negativo para inserção/transcrição de NcP1;

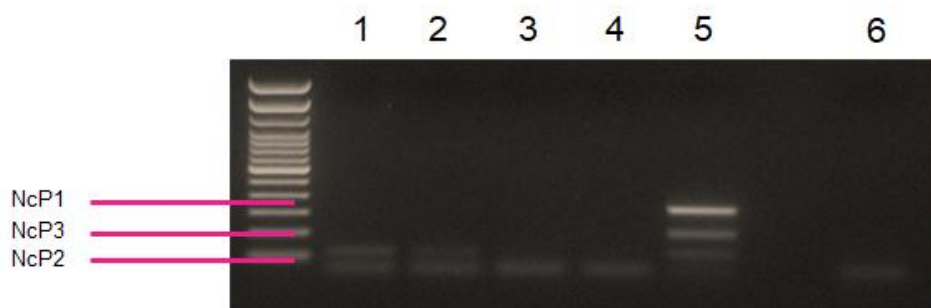
ND: não detectado (não houve resultado. Ex.: problemas na extração, ou não recebimento de ambas as amostras etc).

Foi investigada também a inserção e transcrição das demais EREs de Nucleocapsídeo, NcP2 e NcP3, em algumas amostras de flebotomíneos investigadas no trabalho. Para tal, foi desenvolvida uma técnica de PCR

multiplex, onde é possível amplificar diferentes produtos em uma mesma reação, usando diferentes oligonucleotídeos. Isso demanda menos tempo para a obtenção dos resultados e menos gastos de reagentes. Foram selecionadas algumas amostras, como células LL-5 e Lulo, *L. longipalpis* de Jacobina da colônia do laboratório, *L. longipalpis* de Lapinha e Colômbia, que são populações que requerem mais investigação, por serem as únicas amostras de insetos adultos a apresentarem inserções da sequência da RNA Polimerase. Além dessas, também foi escolhida a amostra de *L. longipalpis* de Serra da Tiririca, do Rio de Janeiro. Outras duas amostras (*Psathiromy sp.* de Manaus e *L. migonei* de Recife) que haviam sido recebidas logo antes da análise entraram também na PCR multiplex. O controle positivo usado foi DNA de células LL-5. As figuras 4.24 e 4.25 mostram alguns desses resultados.



**Figura 4.24:** Amplificação por PCR multiplex das sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 a partir de DNA. Amostras de DNA: 1) *L. longipalpis* (Campo Grande); 2) *L. longipalpis* (Piauí); 3) *Psathiromy sp.* (Manaus); 4) *L. migonei* (Recife); 5) LL-5 e 6) Controle negativo.



**Figura 4.25:** Amplificação por PCR multiplex das sequências de NcP1, NcP2 e NcP3 a partir de cDNA. Amostras de cDNA: 1) *L. longipalpis* (Campo Grande); 2) *L. longipalpis* (Piauí); 3) *Psathiromy sp.* (Manaus); 4) *L. migonei* (Recife); 5) LL-5 e 6) Controle negativo.

A tabela a seguir, elucida os resultados referentes à inserção e transcritos de NcP2 e NcP3 realizadas até o momento:

**Tabela 4.4:** Resultado inserção e transcritos de NcP2 e NcP3 em amostras de flebotomíneos do Novo Mundo.

<b>Amostras</b>	<b>NcP1 DNA</b>	<b>NcP1 cDNA</b>	<b>NcP2 DNA</b>	<b>NcP2 cDNA</b>	<b>NcP3 DNA</b>	<b>NcP3 cDNA</b>
LL-5	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Lulo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>L. longipalpis</i> Jacobina	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho
<i>L. longipalpis</i> Lapinha	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>L. longipalpis</i> Colômbia	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho
<i>L. longipalpis</i> Santarém	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho
<i>L. longipalpis</i> Piauí	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
<i>L. longipalpis</i> S. da Tiririca	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>L. longipalpis</i> C. Grande	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>Psathiromy</i> Manaus	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
<i>L. migonei</i> Recife	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho

Em verde: positivo para inserção/transcrição de NcP2 e NcP3

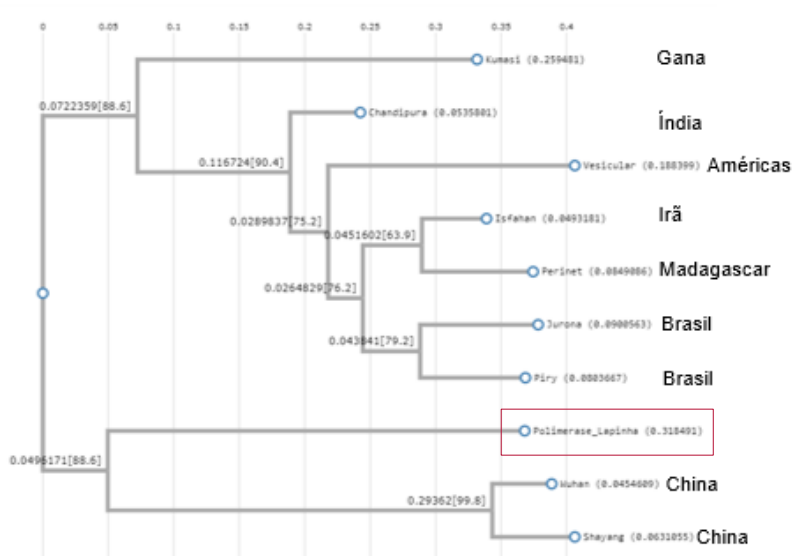
Em vermelho: negativo para inserção e transcrição de NcP2 e NcP3

### 4.3 Resultados prévios da RNA Polimerase

Assim como com as sequências de Nucleocapsídeo, foi realizado um alinhamento das sequências de RNA polimerase, denominadas Pol1, Pol2 e Pol3. Após a tradução das mesmas, o alinhamento foi feito contra sequências de proteínas de RNA polimerase de outros Rhabdovírus (**Figura 4.26**). O resultado desse alinhamento sugeriu que poderiam ser sequências de um mesmo gene de RNA polimerase de Rhabdovírus, uma vez que elas alinhavam em regiões diferentes. As nossas sequências estão marcadas pelo retângulo vermelho. Através de análise filogenética, pôde-se observar que a nossa sequência da RNA Polimerase, apresentava um ancestral em comum distante com dois vírus da China, onde foi possível observar um processo de especiação através da ramificação na filogenia.

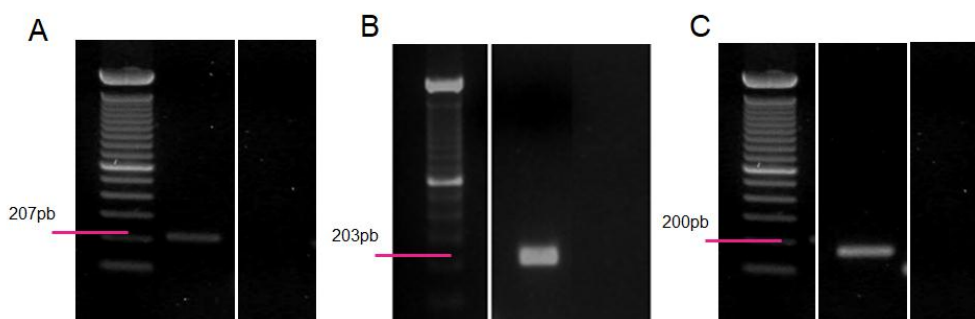
	800	810	820	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Pol1/1-129	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pol2/1-130	QVICTQYKVRQFKSEE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pol1_2/1-872	QVICTQYKVRQFKSDLELIRHIRDITEN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Istahan_virus/1-2093	QVICTQYKTKQHRNETELRSALTQMKLN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Jurona_virus/1-2090	QVICTQYKTKQHRSEIELRGALEQMKSN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Perinet_virus/1-2094	QVICTQYKTKQHRDHELRSALLQMKLN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Chandipura_virus/1-2101	QVICTQYKTKQFRNDELRLQALKQMAAN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Maipais_Spring_virus/1-2105	QVICTQYKTKQHRNEEELKMALNQMKAN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Morreton_virus/1-2109	QVICTQYKTKKSRNDELQALNQMVLN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Maraba_virus/1-2109	QVICTQYKTKKSRNDELKAAALQMVSN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Wuhan_Fly_Virus_2/1	QVICTQYKLOKFRTEEELKTNITNIVAN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vesicular_stomatitis_N	QVICTQYKTKKTRSELELRVLHQMAGN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cocal_virus/1-2108	QVICTQYKTKKSRDDTELRALKQMVSN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Vesicular_stomatitis_I	QVICTQYKTKKSRNVVELOGALNQMVSN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Wuhan_Tick_Virus_1/1	QVICTKYKIPSNLDVNAHAEELKVFVN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nayun_tick_rhabdovirus/1-2109	QVICTQYKTKNYKNEEELKMLLSAMVDN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pike_fly_rhabdovirus/1-2109	QVICTQYKTKNYKNEEELKMLLSAMVDN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Shayang_Fly_Virus_2/1	QVICTQYKLOKQYRTDEELQDNINKIVSN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
American_bat_vesicular_stomatitis	QVICTQYKTKNYRNEELVCLLEQIKLN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Keuraliba_virus/1-2112	QVVCTIYKLNYSPTLQDLIRNLENICRN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**Figura 4.26:** Blastp com as sequências da RNA Polimerase Pol1 e Pol2+Pol3 contra o banco de dados de Rhabdovírus (*output* gerado pelo software Jailview). Nossas sequências estão marcadas em vermelho.

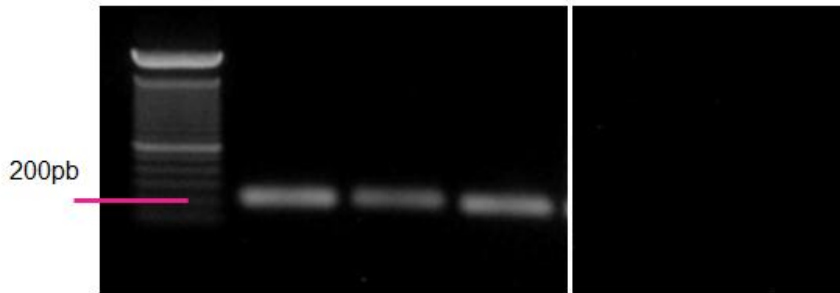


**Figura 4.27:** Árvore filogenética com a sequência da RNA Polimerase e sequências de RNA Polimerase de outros vírus. Nossa sequência está destacada pelo retângulo rosa.

Em células LL-5, o resultado obtido através de PCR, foi positivo para amostras de cDNA (**Figura 4.28**). O DNA dessas células também foi usado e, assim como com os de Nucleocapsídeo, houve amplificação, sugerindo também, inserção no genoma dessas células (**Figura 4.29**).



**Figura 4.28:** Amplificação da sequência de polimerase a partir de DNA de células LL-5. A) Primers Pol1; B) Primers Pol2 e C) Primers Pol3

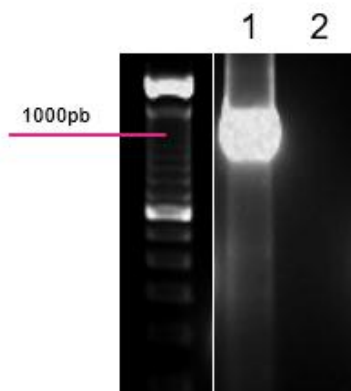


**Figura 4.29:** Amplificação da sequência de RNA polimerase a partir de cDNA de células LL-5: A) Primers Pol1; B) Primers Pol2 e C) Primers Pol3. Ao lado direito, os controles negativos de cada primer

O alinhamento das sequências da RNA Polimerase (Pol1, Pol2 3 Pol3) mostrou que as sequências Pol2 e Pol3 apresentavam uma sobreposição. Portanto a partir daí consideramos as sequências Pol1 e Pol2+3. Entre essas duas sequências, havia uma lacuna não preenchida.

#### 4.3.1 Resultados da RNA Polimerase

Como forma de tentar preencher a lacuna que havia entre as sequências (Pol1 e Pol2+3), foram realizadas PCRs com diferentes combinações dos oligonucleotídeos que haviam sido desenhados para essas sequências. Uma dessas combinações gerou uma banda de ~1000 pares de base, que foi sequenciada (**Figura 4.30**).

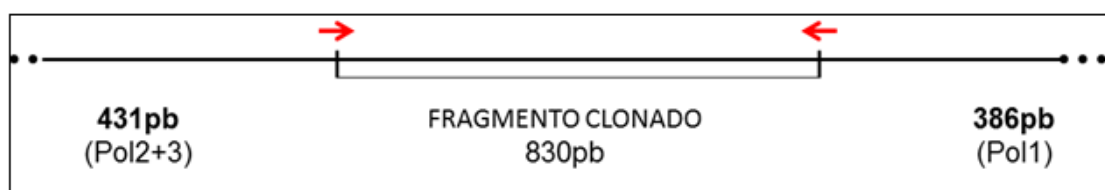


**Figura 4.30:** PCR realizada com a combinação dos oligonucleotídeos Pol1 e Pol2. A amostra utilizada foi DNA de células LL-5. 1) DNA LL-5 e 2) Controle negativo

A sequência gerada por essa combinação de oligonucleotídeos foi alinhada com as demais sequências (Pol1 e Pol2+3), e preencheu a lacuna que havia entre as mesmas (**Figura 4.31**). Portanto, o que antes eram duas



sequências, neste momento era uma sequência única e linear, de pouco mais de 1600 pares de base.



**Figura 4.31:** Representação esquemática da localização do fragmento clonado em alinhamento com as demais sequências da Polimerase. Fragmento de 1647 pares de base.

Em paralelo com essas análises, foram realizadas PCRs para identificação da sequência da RNA Polimerase em amostras de DNA e cDNA de flebotomíneos de diferentes regiões, assim como foram realizadas com as sequências de Nucleocapsídeo. Porém, curiosamente, não foi identificada sua presença em nenhuma das amostras, apenas em células LL-5 (**Figura 4.32**).



**Figura 4.32:** PCR representativa com primer Pol1 da Polimerase com amostras de DNA de flebotomíneos. 1 – *L. longipalpis* (Santarém); 2 – *L. longipalpis* (Jacobina); 3 – *L. longipalpis* (Campo Grande); e 4 – *L. longipalpis* (Pancas), para o gene alvo Pol1a; 5 – *L. longipalpis* (Santarém); 6 – *L. longipalpis* (Jacobina); 7 – *L. longipalpis* (Campo Grande); e 8 – *L. longipalpis* (Pancas), para o gene alvo Pol1b; 9 – *L. longipalpis* (Santarém); 10 – *L. longipalpis* (Jacobina); 11 – *L. longipalpis* (Campo Grande); e 12 – *L. longipalpis* (Pancas), para o gene alvo Pol2; 13 – *L. longipalpis* (Santarém); 14 – *L. longipalpis* (Jacobina); 15 – *L. longipalpis* (Campo Grande); e 16 – *L. longipalpis* (Pancas), para o gene alvo Pol3; 17 – Controle positivo: DNA LL5; 18 – Controle negativo.

Não foi possível fazer a identificação dessa sequência no genoma de *L. longipalpis* e nem delimitar as regiões flanqueadoras, uma vez que o genoma anotado no banco de dados *VectorBase* é de insetos de Jacobina (Bahia) e essa população não compartilha da inserção. Portanto, para continuar a identificação da sequência nucleotídica inserida no genoma de células LL-5, para saber a real extensão desse fragmento e, se seria um gene inteiro,

optamos por utilizar a técnica de PCR inversa, técnica realizada para amplificar regiões desconhecidas do genoma, que flanqueiam uma sequência já conhecida. É realizada através de: digestão enzimática com enzimas de restrição específicas previamente selecionadas através de um mapa de restrição (**Figura 4.33**). Foi usado o *Software* Restriction Analyzer (Molbiotools).

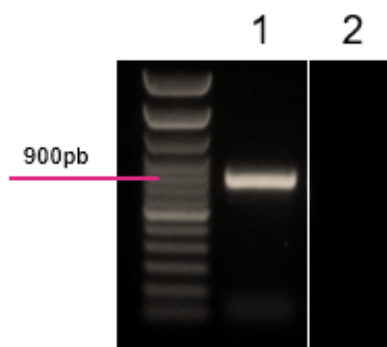


**Figura 4.33:** Primeira etapa da técnica de PCR inversa. Mapa de restrição para identificação das enzimas a serem usadas e desenho dos oligonucleotídeos. *HindIII* foi uma das enzimas usadas no experimento. Seu sítio de restrição está marcado pelo quadrado azul.

O DNA é então digerido (**Figura 4.34**) e logo após, diluído para favorecer o autoanelamento e impedir que ocorram concatâmeros, e as extremidades digeridas são ligadas com a enzima T4 DNA ligase. Em seguida este material ligado é amplificado por PCR, gerando produtos que, posteriormente, serão clonados e sequenciados (**Figura 4.36**).

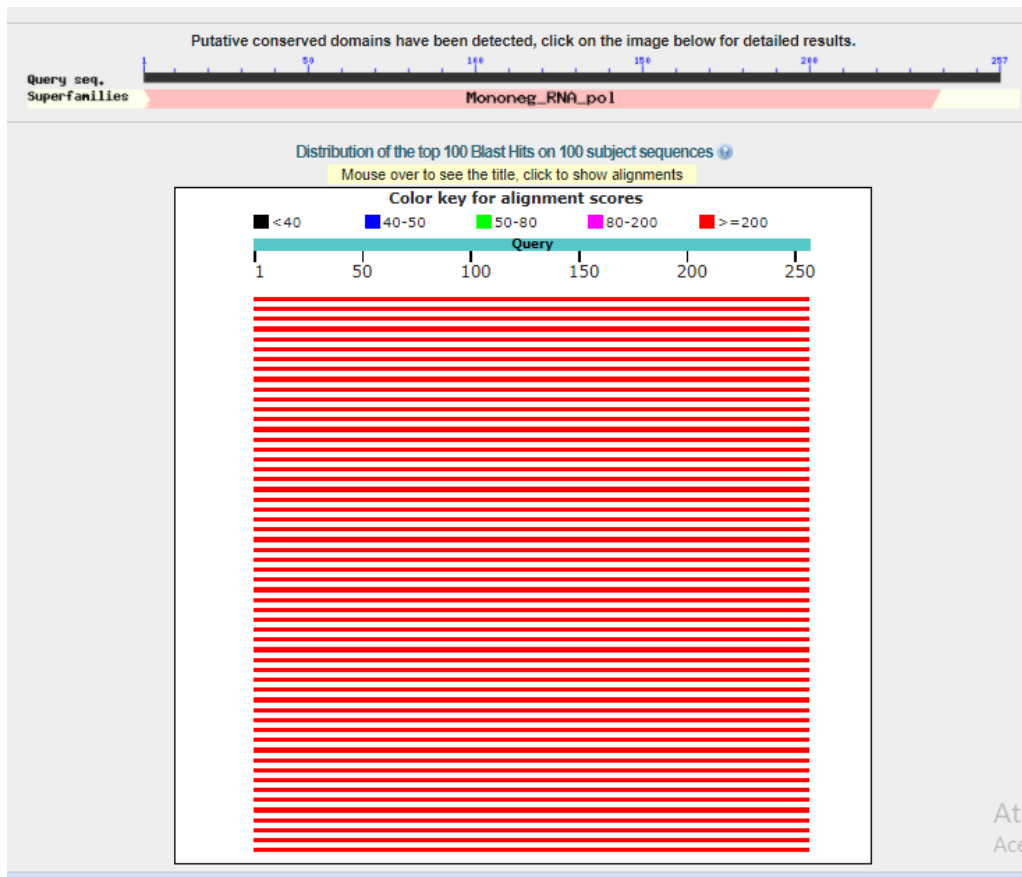


**Figura 4.34:** Segunda etapa da técnica de PCR inversa. DNA de células LL-5 digerido com a enzima *Hind*III. 1) DNA de LL-5 sem digerir e 2) Digestão enzimática



**Figura 4.35:** PCR com DNA de LL-5 digerido e ligado. 1) Produto a ser clonado e sequenciado 2) Controle negativo da reação

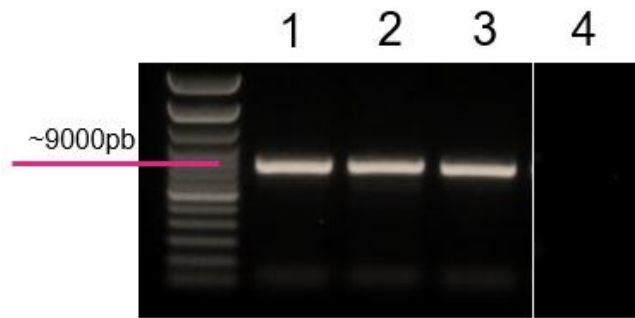
O uso da técnica permitiu identificar, inicialmente, 900 pares de base para a região 5'. O alinhamento da sequência está na figura 4.36 abaixo:



**Figura 4.36:** Blastp sequência Polimerase obtida através da PCR inversa (região 5')

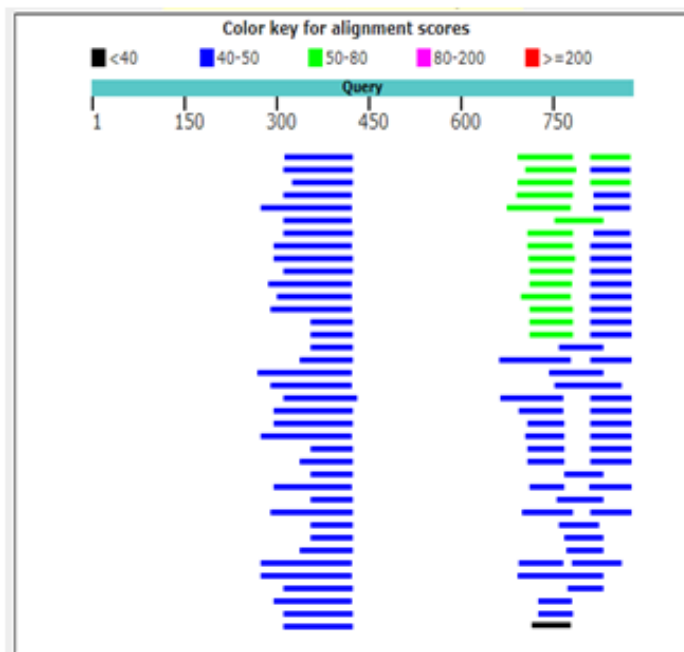
A partir do resultado obtido pela PCR inversa (**Figura 4.36**), a sequência da RNA Polimerase apresenta 2554 pares de base de extensão, o que corresponde a aproximadamente metade do gene da RNA Polimerase de Rhabdovírus.

Para identificar a sequência na região 3' do fragmento conhecido, a mesma técnica foi realizada. Entretanto, após o sequenciamento foi visto que os fragmentos obtidos eram artefatos (**Figuras 4.37 e 4.38**).



**Figura 4.37:** Amplificações obtidas da PCR inversa para a região 3'. Enzimas: 1) *Clal*, 2) *NdeI* e 3) *BglII*

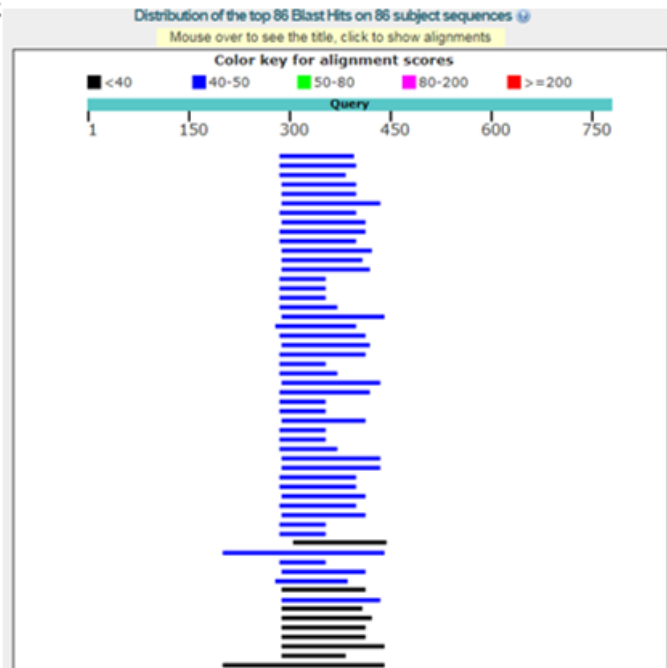
A



B

Alignments <span>Download</span> <span>GenPept</span> <span>Graphics</span>						
	Description	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Methyl-coenzyme M reductase alpha subunit (uncultured archaeon)	57.4	10%	2e-06	87%	<a href="#">CBF64715.1</a>
<input type="checkbox"/>	putative retinoic acid converting enzyme (Hirudo medicinalis)	58.5	9%	3e-06	96%	<a href="#">CCJ09773.1</a>
<input type="checkbox"/>	Methyl-coenzyme M reductase alpha subunit (uncultured archaeon)	57.4	10%	3e-06	87%	<a href="#">CBF64720.1</a>
<input type="checkbox"/>	Methyl-coenzyme M reductase alpha subunit (uncultured archaeon)	57.0	10%	4e-06	84%	<a href="#">CBF64719.1</a>
<input type="checkbox"/>	allatotrocin neuropeptide precursor (Scolecoperla frugiperda)	53.1	11%	5e-06	72%	<a href="#">CAD96809.1</a>
<input type="checkbox"/>	LacZ-alpha (Shuttle vector qi_PV111)	54.3	8%	1e-05	100%	<a href="#">AAS77687.2</a>
<input type="checkbox"/>	putative heat shock protein isoform a (Lithodes maja)	55.1	8%	1e-05	100%	<a href="#">CEK41093.1</a>
<input type="checkbox"/>	putative heat shock protein isoform b (Lithodes maja)	54.7	8%	2e-05	100%	<a href="#">CEK41093.1</a>
<input type="checkbox"/>	hemagglutinin esterase, partial (Salmonella typhimurium)	55.8	8%	4e-05	100%	<a href="#">CAR56829.1</a>
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein (Bacillus thuringiensis)	54.3	7%	7e-05	100%	<a href="#">WP_013555134.1</a>
<input type="checkbox"/>	nitrite reductase (uncultured bacterium)	52.0	8%	7e-05	100%	<a href="#">BAH95949.1</a>
<input type="checkbox"/>	nitrite reductase (uncultured bacterium)	50.8	7%	2e-04	100%	<a href="#">BAH95951.1</a>
<input type="checkbox"/>	mannanase superoxide dismutase (Taiwanofungus camphoratus)	51.6	9%	2e-04	85%	<a href="#">CAD42938.2</a>
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein (Bacillus thuringiensis)	49.3	7%	3e-04	95%	<a href="#">WP_013555136.1</a>
<input type="checkbox"/>	APS reductase alpha subunit (endosymbiont of Sclerotium contortum)	50.8	8%	4e-04	100%	<a href="#">CAP03145.1</a>
<input type="checkbox"/>	APS reductase alpha subunit (endosymbiont of Oligotrichia haakonmosbiensis)	50.8	8%	4e-04	100%	<a href="#">CAP03143.1</a>
<input type="checkbox"/>	APS reductase alpha subunit (endosymbiont of Oligotrichia haakonmosbiensis)	50.4	8%	4e-04	100%	<a href="#">CAP03144.1</a>

C



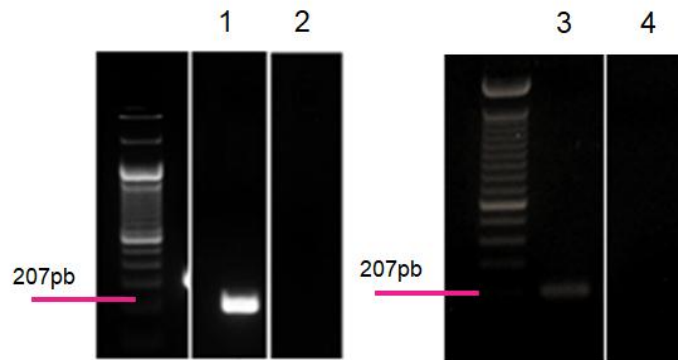
D

Sequences producing significant alignments:	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Alignments: 20 Download v. Load/Save/Clipboard	48.1	48.1	14%	0.007	49%	<a href="#">XP_023945404.1</a>
	48.1	48.1	14%	0.007	47%	<a href="#">XP_023945174.1</a>
<input type="checkbox"/> uncharacterized orf:LOC112051134 (Brugia malayi)	47.8	47.8	12%	0.008	55%	<a href="#">XP_023942450.1</a>
<input type="checkbox"/> uncharacterized orf:LOC112055928 (Brugia malayi)	46.6	46.6	14%	0.032	51%	<a href="#">XP_014369266.1</a>
<input type="checkbox"/> uncharacterized orf:LOC112049972 (Brugia malayi)	46.2	46.2	14%	0.047	51%	<a href="#">XP_014364293.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC109713438 (Pleisio machaoi)	43.9	43.9	18%	0.047	45%	<a href="#">OCT55813.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC109715505 (Pleisio machaoi)	42.4	42.4	14%	0.080	47%	<a href="#">ETW693509.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:KX142V_1300237no (Drosophila levis)	45.1	45.1	16%	0.088	43%	<a href="#">OCT88103.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:ET9V2_51300 (Cardinalis eleutheroides sensu)	43.5	43.5	16%	0.12	40%	<a href="#">XP_014355040.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:KX142V_1301012no (Drosophila levis)	44.3	44.3	14%	0.13	45%	<a href="#">XP_013142202.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC109700082 (Pleisio machaoi)	42.7	42.7	17%	0.14	44%	<a href="#">OCT87563.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC109190200 (Pleisio machaoi)	42.7	42.7	15%	0.17	43%	<a href="#">OCT90057.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:KX142V_1301245no (Drosophila levis)	42.0	42.0	16%	0.17	41%	<a href="#">OCT89815.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:KX142V_1301542no (Drosophila levis)	43.5	43.5	8%	0.20	74%	<a href="#">XP_011865390.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC105560911 (Pollenhoa emeri)	44.3	44.3	8%	0.25	74%	<a href="#">XP_011858564.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC105556100 (Pollenhoa emeri)	43.5	43.5	8%	0.27	74%	<a href="#">XP_011862457.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized orf:LOC105530014 (Pollenhoa emeri)	43.1	43.1	11%	0.35	59%	<a href="#">XP_018577260.1</a>
<input type="checkbox"/> uncharacterized orf:LOC109115553 (Apocheilichia stictocarpa)	43.1	43.1	11%	0.35	59%	<a href="#">XP_018577260.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical orf:KX142V_13014772no (Drosophila levis)	42.0	42.0	19%	0.40	39%	<a href="#">OCT91664.1</a>

**Figura 4.38:** Alinhamento do resultado obtido da PCR inversa para a região 3' do fragmento conhecido, através da ferramenta BLAST. A e B) *ClaI* e C e D) *BgIII*. O resultado obtido pela enzima *NdeI* não apresentou quaisquer similaridades.

Para dar continuidade ao projeto, estamos desenhando um novo par de oligonucleotídeos para as regiões 5' e 3'.

Uma vez que a inserção do fragmento do gene de polimerase foi vista apenas em células LL-5, e estas foram obtidas de *L. longipalpis* coletadas na Gruta de Lapinha, no estado de Minas Gerais (Tesh, 1983), investigamos a presença deste inserto nestes insetos. A hipótese era baseada, portanto, na possibilidade de que essa inserção da sequência da RNA Polimerase pudesse estar restrita a essa população de flebotomíneos de Minas Gerais. Quando insetos provenientes de Lapinha foram testados, houve amplificação nas amostras de DNA, o que indicava inserção do fragmento do gene de RNA polimerase no genoma desses flebotomíneos. Além disso, estes insetos também transcreviam esse fragmento (**Figura 4.39**).



**Figura 4.39:** Amplificação de Pol1 em amostras de DNA e cDNA de flebotomíneos de Lapinha; 1 – DNA *L. longipalpis* Lapinha; 2 – Controle negativo; 3 – cDNA *L. longipalpis* Lapinha; 4 – Controle negativo.

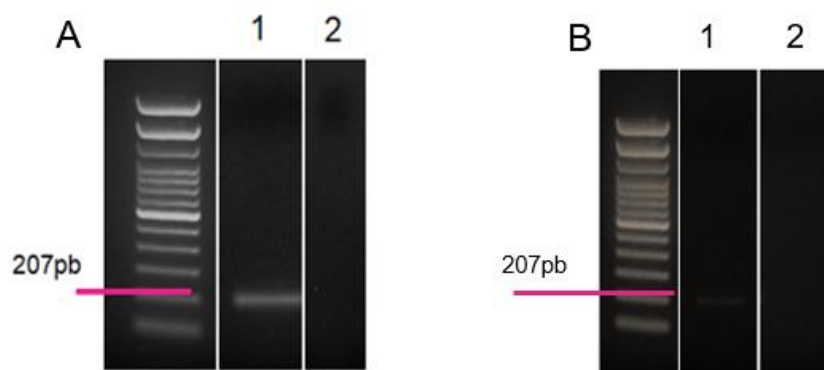
A investigação da inserção desse gene, também foi realizada nas células Lulo, que são, assim como LL-5, uma linhagem embrionária de *L. longipalpis*, mas obtidas de flebotomíneos da Colômbia (Rey, 2000), e estas células também apresentaram inserção no genoma e transcrito (**Figura 4.40**).



**Figura 4.40:** PCR com oligonucleotídeo Pol1 com amostras de DNA (A) e cDNA (B) de células Lulo, sendo 2) controle negativo de cada reação

Seguindo o mesmo raciocínio entre LL-5 e Lapinha, investigamos a presença desse fragmento da RNA Polimerase em insetos da mesma proveniência dessas células. Amostras de *L. longipalpis* da Colômbia foram obtidas e foi visto que também apresentavam inserção e transcrição do fragmento do gene da RNA polimerase de Rhabdovírus (**Figura 4.41**).





**Figura 4.41:** A) PCR com oligonucleotídeo Pol1 em amostras de DNA (A) e cDNA (B) de *L. longipalpis* da Colômbia

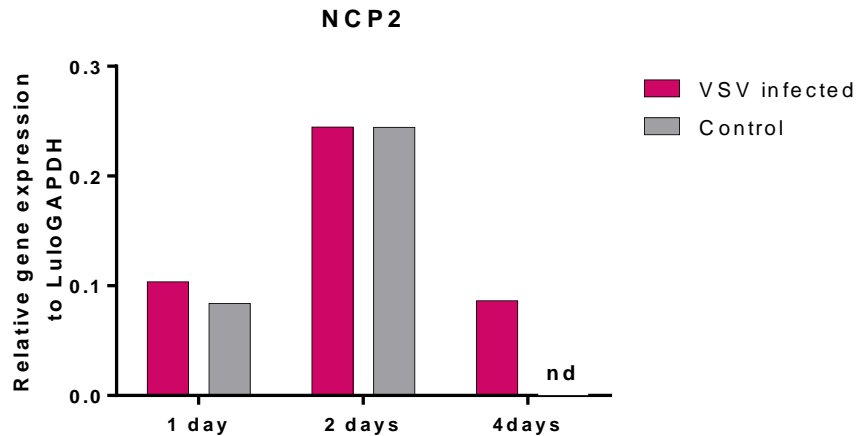
#### 4.4 Análise de expressão gênica de NcP2 em *L. longipalpis* do Piauí infectados por VSV.

Inserções virais podem desempenhar papéis importantes na imunidade de seus hospedeiros, como a resistência à infecções virais, processo este conhecido por exaptação (Fort et. al, 2012).

Ferreira e colaboradores, 2018, analisaram o perfil de expressão de miRNAs em flebotomíneos após infecção pelo Vírus da Estomatite Vesicular (VSV). Não houve produção de RNAs Piwi (PiRNA) que, em mosquitos, são ativados em infecções virais.

Em experimentos anteriores já havíamos identificado a presença e transcrição de NcP2 em *L. longipalpis* provenientes do Piauí (ver **figura 4.25**). Recebemos amostras de cDNA de *pools* desses flebotomíneos infectados e não infectados pelo Vírus da Estomatite Vesicular em diferentes horários pós alimentação.

Por isso, para saber se havia alguma modulação nos transcritos de NcP2, induzida pela infecção por VSV, foi empregada a técnica de PCR quantitativa (descrita com mais detalhes na seção de materiais e métodos) (**Figura 4.42**).



**Figura 4.42:** PCR quantitativa do gene NcP2 em fêmeas de *L. longipalpis* em 1, 2 e 4 dias após alimentação sanguínea. Rosa: sangue + VSV / cinza: controle (sangue). A amostra controle de 4 dias não amplificou (ND: não detectável).

Este resultado mostrou que não houve diferença de expressão de NcP2 nos flebotomíneos infectados, comparados ao controle.

#### 4.5 Identificação de possíveis traduções das sequências rhabdovirais transcritas

Uma vez que existem evidências anteriores na literatura, sobre a produção de proteínas funcionais a partir de inserções genômicas de vírus de RNAs não retrovirais (Fujino et al., 2014), levantou-se a possibilidade de haver tradução das sequências transcritas a partir dos EREs presentes no genoma de flebotomíneos. Para responder essa hipótese, como perspectiva futura será usada a técnica de *western blot*.

## V. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e o barateamento das técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos revelou que eucariotos de diferentes filos apresentavam sequências de origem viral inseridas em seus genomas. Essas sequências, parciais ou totais, de genes virais são conhecidas como Elementos Virais Endógenos (EVEs). Como era de se esperar a maior parte dos EVEs têm origem retroviral. Esses elementos retrovirais endógenos (ERVEs) correspondem a cerca de 8% de todo DNA humano (Jern, P. et al., 2008). Mas as sequências virais derivadas de retrovírus não são as únicas que estão presentes nos diversos genomas estudados. Em 2011, Horie e colaboradores identificaram a presença de sequências que codificavam para uma proteína homóloga de nucleoproteína de Bornavirus em diferentes mamíferos, incluindo o homem, macacos, roedores e elefantes. Esses elementos bornavirais endógenos (EBVEs) podem se apresentar como ORFs totais ou parciais, sendo que vários deles são transcritos. O interessante a respeito desse achado é o fato que Bornavírus são vírus de RNA fita simples negativa, cujo genoma nunca se apresenta como DNA durante o seu processo replicativo.

A presença de EVEs não retrovirais foi identificada em diversos outros organismos. Sequências de Totivirus, cujo genoma é formado por RNA de dupla fita, foram encontradas integradas ao genoma dos fungos *Candida parapsilosis*, *Penicillium marneffeii* and *Uromyces appendiculatus*. Além de integrados esses elementos totivirais também estavam sendo transcritos. Fort e colaboradores, 2012, identificaram mais de 180 sequências de Rhabdovirus no genoma de diferentes animais (insetos, aracnídeos, piolho do mar, traças etc), mas principalmente em *Aedes aegypti* e *Ixodes scapularis*. Foram encontradas sequências codificantes para nucleoproteínas, glicoproteínas e RNA polimerase dependente de RNA. Os genomas de artrópodes contêm sequências derivadas de integrações de vírus de DNA e RNA não retrovirais. Esses EVEs foram adquiridos ao longo da evolução e servem como um registro de infecções virais anteriores. O papel dos EVEs tem sido alvo de especulações e a maioria das evidências aponta para sua participação nos mecanismos de defesa dos organismos. Evidências recentes indicam que os EVEs podem funcionar como modelos para a biogênese de RNAs que

interagem com PIWI (piRNAs). Piwi é uma abreviatura de *P-element Induced Wimp* em *Drosophila*. As proteínas Piwi são proteínas de ligação a RNA altamente conservadas presentes em diversos organismos. Pertencem à família Argonaute/Piwi, envolvidas em mecanismos de RNA de interferência (Cox, DN. et al., 1998). Estudos têm demonstrado a participação de piRNAs derivados de EVEs na resposta imune antiviral inata em mosquitos (Léger P. et al., 2012 e Varjak, M. et al., 2017).

Nossas sequências de Nucleocapsídeo (NcP) e RNA Polimerase (Pol) foram investigadas pelo bioinformata Eric Aguiar, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, em bibliotecas de small RNAs de *L. longipalpis*. Todas as sequências foram encontradas nestas bibliotecas. NcP1.1 apresentou perfil consistente com a ativação da via piRNA (acúmulo de pequenos RNAs entre os tamanhos 23-29 nt) e NcP2 e Pol, perfil consistente com degradação (acúmulo de pequenos RNAs entre tamanhos 10-16nt). Assim, com exceção de Pol que não está no genoma de *L. longipalpis* e não gera pequenos RNAs, os demais *contigs* mostraram características claras de Elementos Virais Endógenos (EVEs).

Há trabalhos na literatura que descrevem a presença de sequências de famílias virais que não fazem retrotranscrição, presentes no genoma de mamíferos, plantas e até mesmo insetos. Nossos resultados também sugerem um processo exaptativo, como descrito por Fort et al., 2012, pelo fato de identificarmos uma inserção genômica de sequências de vírus de RNAs não retrovirais, que são transcritas. Sabendo exatamente essa localização e por se tratarem de três sequências de Rhabdovírus distintas, nossa hipótese é baseada na possibilidade de que tenha acontecido uma infecção viral há milhões de anos. Nesse caso, o RNA viral pode ter sido convertido em DNA por ação de transcriptases reversas e, por ação de retrotransposons, essas sequências virais podem ter migrado para dentro dos íntrons desses genes. Isto pode explicar como essas sequências são transcritas e o porquê de não serem degradadas.

Os vírus de RNA são submetidos a taxas de substituição de nucleotídeos muito altas. Fort e colaboradores (2012) discutem que muitas dessas inserções podem estar presentes nos hospedeiros desde vários

milhões de anos, possivelmente desempenhando um papel funcional na biologia do hospedeiro.

Nossos resultados podem sugerir que esses flebotomíneos podem ter sido submetidos a episódios infecciosos repetidos de Rhabdovírus durante sua história de evolução, o que levou ao acúmulo de diferentes sequências integradas. Também sugerem que, assim como os retrovírus, as sequências rhabdovirais integradas podem, de alguma forma, atuar na imunidade antiviral dos hospedeiros. Como provavelmente essas inserções são antigas e estão sendo mantidas, além de estarem sendo transcritas, podem trazer benefícios para esses insetos. O processo exaptativo, proposto por Fort et. al, 2012, suporta esta hipótese. Um exemplo de processo exaptativo, é a resistência às infecções virais. Essas inserções podem ser transcritas e até traduzidas e essas moléculas podem atuar frente a infecções virais (Fujino et al., 2014).

Em uma análise inicial, observou-se que não houve modulação dos transcritos de NcP2 em *L. longipalpis* infectados por VSV (ver Fig. 4.42). No tempo de dois dias após alimentação sanguínea, houve um aumento da expressão de NcP2 em ambos os grupos (com e sem VSV), que pode, de alguma forma, ter sido estimulado pela alimentação. Mais análises são necessárias para comprovar e discutir se esses transcritos estão envolvidos com imunidade antiviral nesses flebotomíneos.

## VI CONCLUSÕES

- A maioria dos flebotomíneos investigados no trabalho apresentam inserções rhabdovirais (NcP1, NcP2 e NcP3) no genoma;
- A maioria apresenta transcritos referentes a essas inserções genômicas;
- A manutenção dessas sequências no genoma desses insetos e a transcrição das mesmas pode representar um processo exaptativo;
- Essas inserções rhabdovirais podem ter sido preservadas pelo fato de estarem inseridas em íntrons de genes de *L. longipalpis*;
- Infecção com o VSV aparentemente não modula a expressão desses transcritos;
- As análises sugerem que há a presença de piRNAs relativos às nossas EREs. Essas moléculas podem estar envolvidas em respostas imunes nesses insetos.

## VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alkan, C.; Zapata, S.; Bichaud, L.; Moureau, G.; Lemey, P.; Firth, A.E.; Gritsun, T.S.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X.; Depaquit, J. Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. *J. Virol.* 2015, 89, 11773–11785.

Ayhan N, Charrel RN. Of phlebotomines (sandflies) and viruses: a comprehensive perspective on a complex situation. *Curr Opin Insect Sci.* 2017 Aug 1;22:117–24.

Baltimore, D. - Expression of animal virus genomes, 1971.

Bates, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol* 11(4): 340-344, 2008.

Barletta AB, Silva MC, Sorgine MH. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasit Vectors.* 2012 Jul 24;5:148. doi: 10.1186/1756-3305-5-148.

Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM (2010) Unexpected Inheritance: Multiple Integrations of Ancient Bornavirus and Ebolavirus/Marburgvirus Sequences in Vertebrate Genomes. *PLOS Pathogens* 6(7): e1001030. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001030>

Brandão-filho, SP., Carvalho, SMS., dos santos, PRBE, Lanza, H. Diversidade de flebotomíneos no Município de Ilhéus, Bahia, 2010.

Cândido, F. Glossário de Epidemiologia, 2004-2007.

Carrera, M. Insetos de interesse médico e veterinário, 1991.

Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* Dec 1;12(23):3715-27. doi: 10.1101/gad.12.23.3715. PMID: 9851978; PMCID: PMC317255, 1998

Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F. e Andry, PE. Arthropod-borne viruses transmitted by phlebotomine sandflies in Europe: A review, 2010.

Dezélée, S., Teninges, D. e Bras, F. Genome Organization of the Sigma Rhabdovirus: Six Genes and a Gene Overlap, 1992 apud Wunner, WH. e Peters, D. Classification and Nomenclature of Viruses, 1991.

Ferreira FV., Aguiar ERGR, Olmo RP, de Oliveira KPV, Silva EG, Sant'Anna MRV, Gontijo NF, Kroon EG, Imler JL, Marques JT. The small non-coding RNA response to virus infection in the Leishmania vector *Lutzomyia longipalpis*. *Ferreira FV, PLoS Negl Trop Dis.* Jun 4;12(6):e0006569. doi: 10.1371/journal.pntd.0006569. PMID: 29864168, 2018.

Fort, F., Albertini, A., Van-hua, A., Berthomieu, A., Roche, S., Delsuc, F., Pasteur, N., Capy, P., Gaudin, Y. e Weill, M. Fossil rhabdoviral sequences integrated into arthropod genomes: ontogeny, evolution, and potential functionality, 2012.

Geevarghese, G., Mavale, MS., Fulmali, PV., Ghodke, YS., Mishra, AC. e Kanojia, P. Experimental transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus argentipes* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), 2007.

Goic, K., Stapleford, A., Frangeul, L., Doucet, AJ., Gausson, V., Blanc, H., Schemmel-Jofre, N., Cristofari, G., Lambrecht, L., Vignuzzi, M., Maria-Carla Saleh. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun.* 2016 Sep 1;7:12410. doi: 10.1038/ncomms12410. PMID: 27580708; PMCID: PMC5025746.



Gradoni L., Bruschi F., editors. The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases, 2018.

Herrer A., Christensen HA., Implication of Phlebotomus sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. Science 190, 154–155, 1975

Horst AM., Nigg JC., Dekker FM., Falk BW. Endogenous viral elements are widespread in arthropod genomes and commonly give rise to PIWI-interacting RNAs. J Virol 93:e02124-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02124-18>, 2019.

Jennings, M. e Boorman, J. The susceptibility of Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva), Diptera, Psychodidae, to artificial infection with three viruses of the Phlebotomus fever group. Ann Trop Med Parasitol. 74(4):455-62, 1980.

Jern P, Coffin JM. Effects of retroviruses on host genome function. Annu. Rev. Genet. 2008;42:709–732.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. Sep;22(9):439-45. Epub 2006 Jul 14, 2006.

Kan Fujino, Masayuki Horie, Tomoyuki Honda, DanaK. Merriman, Keizo Tomonaga. Inhibition of BDV replication by a squirrel EBLN. Proceedings of the National Academy of Sciences Sep, 111 (36) 13175-13180; DOI: 10.1073/pnas.1407046111, 2014.

Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, Methods, Volume 25, Issue 4, 2001, Pages 402-408, ISSN 1046-2023, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Léger P, Lara E, Jagla B, Sismeiro O, Mansuroglu Z, Coppée JY, Bonnefoy E, Bouloy M. J Virol. Feb;87(3):1631-48. doi: 10.1128/JVI.02795-12. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23175368, 2013.

Longdon, B., Obbard, DJ., Jiggins, FM. Sigma viruses from three species of *Drosophila* form a major new clade in the rhabdovirus phylogeny. Published online. Oct 7. doi: 10.1098/rspb.2009.1472 PMID: 19812076 , 2009. PMCID: PMC2842628

Lainson R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revta Pan-Amaz. Saúde 1:13-32, 2010.

Lyles, DS., Rupprecht, CE. Rhabdoviridae. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE, editors. Fields Virology. 5. Vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia, Pennsylvania: pp. 1363–1408, 2007.

Lehane, MJ. The Biology of Blood-Sucking in Insects, 2005.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol.;27(2):123–47, 2013.

Martins-da-Silva A, Telleria EL, Batista M, Marchini FK, Traub-Csekö YM, Tempone AJ. Identification of Secreted Proteins Involved in Nonspecific dsRNA-Mediated *Lutzomyia longipalpis* LL5 Cell Antiviral Response. *Viruses*. 2018;10(1):43. Published Jan 18. doi:10.3390/v10010043, 2018.

Ministério da Saúde. Leishmaniose. Biblioteca Virtual em Saúde, setembro/2015. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/html/pt/dicas/126leishmaniose.html>

Moon, AE., Walker AJ., Goodbourn, S. Regulation of transcription of the *Aedes albopictus* cecropin A1 gene: A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011, v. 41, p. 628-636.

Moreno, J., Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model, Trends in Parasitology, Volume 18, Issue 9, Pages 399-405, 2002.

Moriconi M., Rugna G., Calzolari M., Bellini R., Albieri A., Angelini P., et al. Phlebotomine sand fly-borne pathogens in the Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. Warburg A, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Aug 10;11(8):e0005660.

Nettles VF., Comer JA., Erickson GA., Corn JL. Isolation of Vesicular Stomatitis Virus New Jersey Serotype from Phlebotomine Sand Flies in Georgia. Am J Trop Med Hyg. May 1;42(5):476-82, 1990.

Pitaluga, AN., Mason, PW. e TRAUB-CSEKO, YM. Non-specific anti-viral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, Lutzomyia longipalpis. Dev. Comp. Immunol. 32:191-197, 2008.

Rey GJ, Ferro C, Bello FJ. Establishment and characterization of a new continuous cell line from Lutzomyia longipalpis (Diptera : Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000; v. 95, p. 103-110.

Rose, JK., Whitt, MA. Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication In: Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D. E. (eds.) Fields Virology, 4. ed., CDRom Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, Section Two: Specific Virus Families, Cap. 38, 2001.

Sadlova, J., Dvorak, V., Seblova, V. et al., *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. Parasites Vectors 6, 186 (2013).

Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis*

braziliensis in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(1):69-72.

Suzuki Y, Frangeul L, Dickson LB, Blanc H, Verdier Y, Vinh J, Lambrechts L, Saleh M-C. 2017. Uncovering the repertoire of endogenous flaviviral elements in *Aedes* mosquito genomes. *J Virol* 91:e00571-17.

Tanji T, Hu X, Weber AN, Ip YT. Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology.* 2007;v. 27, n. 12, p. 4578-4588.

Tassetto, M., Mark Kunitomi, Zachary J Whitfield, Patrick T Dolan, Irma Sanchez-Vargas, Miguel Garcia-Knight, Isabel Ribiero, Taotao Chen, Ken E Olson, Raul Andino. Control of RNA viruses in mosquito cells through the acquisition of vDNA and endogenous viral elements, 2019

Taylor, DJ., Leach, RW., Bruenn, J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes, 2010.

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

Tinoco-nunes, B., Telleria EL., Silva-neves M., Marques, C., Azevedo-brito, DA., Pitaluga, AN., Traub-cseko, YM. The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*, *Parasites & Vectors*, 2016.

Tolle, M. A. - Review - Mosquito-borne diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 39(4):97-140, 2009.

Travassos da Rosa, APA., Shope, RE., Pinheiro, FP. Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: UREN, M. F., BLOK, J. e MANDERSON, L. H. (Ed.).

Proceedings fifth symposium on arbovirus research in Australia. Brisbane: University of Queensland Medical School, p.4-8, 1989.

Tesh, RB., Modi, GB. Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses, *J. Med. Entomol.* Vol 20, no 2: 199-202, 1983.

Varjak M, Maringer K, Watson M, Sreenu VB, Fredericks AC, Pondeville E, Donald CL, Sterk J, Kean J, Vazeille M, Failloux AB, Kohl A, Schnettler E. *Aedes aegypti* Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. *mSphere*. 2017 May 3;2(3):e00144-17. doi: 10.1128/mSphere.00144-17. eCollection May-Jun.PMID: 28497119, 2017.

Vasconcelos PFC., Travassos da Rosa ES., Tesh RB. Characterization of two new phleboviruses associated with human illness from the Amazon region of Brazil. In: *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. p. 100–6, 1998.

Vasilakis N., Steven Widen, Sandra V. Mayer, Robert Seymour, Thomas G. Wood, Vsevolov Popov, Hilda Guzman, Amelia P.A. Travassos da Rosa, Elodie Ghedin, Edward C. Holmes, Peter J. Walker, Robert B. Tesh, Niakha virus: A novel member of the family Rhabdoviridae isolated from phlebotomine sandflies in Senegal, *Virology*, Volume 444, Issues 1–2, 2013

Vélez ID., Alvar J., Bern C., Herrero M., Desjeux, P., et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS ONE* 7(5): e35671, 2012.

Walker, P.J., Blasdell, K.R., Calisher, C.H., Dietzgen, R.G., Kondo, H., Kurath, G., Longdon, B., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., Vasilakis, N., Whitfield, A.E., and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Rhabdoviridae*, *Journal of General Virology*, 99:447–448, 2018.

Weaver, SC., Kang, W., Shirako, Y., Rumenapf, T., Strauss, EG., Strauss, JH. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol.* 71(1):613-23, 1997.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, WHO: 211, 2015.

Young, DG., Duncan, MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, central and South America (Diptera: Psychodidae), 1994.