

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Prospecção de *Leishmania* RNA vírus (LRV1) em cepas de
Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes
com diferentes formas clínicas**

por

Diego Henrique Fagundes Macedo

**Belo Horizonte
2016**

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR D.H.F. MACEDO 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Prospecção de *Leishmania* RNA vírus (LRV1) em cepas de
Leishmania (Viannia) braziliensis isoladas de pacientes
com diferentes formas clínicas**

por

Diego Henrique Fagundes Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. Orientação: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
Co-orientação: Dra. Célia Maria Gontijo

**Belo Horizonte
2016**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M141p Macedo, Diego Henrique Fagundes.
2015

Prospecção de LRV1 em *Leishmania braziliensis* do estado de Minas Gerais / Diego Henrique Fagundes Macedo. – Belo Horizonte, 2015.

XIII, 35 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 43 - 48

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose cutânea/genética 2. *Leishmania braziliensis*/genética 3. Biologia Molecular/métodos. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação). III. Gontijo, Célia Maria (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Diego Henrique Fagundes Macedo

Prospecção de *Leishmania* RNA vírus (LRV1) em cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Cristiana Ferreira Alves de Brito (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Claudia Masini d'Avila-Levy (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Marco Antônio Silva Campos (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 26/02/2016.

Dedicatórias

Dedico este Mestrado aos meus Pais, Marlucia e Manoel e aos meus irmãos, Thiago e Emanuely, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

A vitória desta conquista é dedicada a vocês com todo meu amor, só vocês! Parabéns!

Agradecimentos

- Aos meus orientadores e amigos Dr. Rodrigo Soares e Célia Gontijo, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de pessoas as quais sempre farão parte da minha vida.
- À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.
- Ao Dr. Armando de Menezes por sua ajuda nos momentos mais críticos, e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido.
- Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.
- Aos meus colegas de trabalho e aos técnicos do laboratório que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.
- As colegas do Laboratório e do grupo GFP por me receberem tão bem, me ajudarem e participarem deste trabalho.
- A Dra. Maria Norma Melo e ao Dr. Felipe Passero pelo apoio e colaboração ao ceder suas preciosas cepas.
- A todos os amigos do Centro de pesquisas René Rachou pelo carinho e apoio.
- A todos os colegas e professores da pós-graduação em ciências da Saúde por todos os ótimos momentos.
- As Agências de fomento científico, Capes, CNPq, e FAPEMIG.

Resumo

Leishmania RNA vírus (LRVs) são comumente encontrados infectando espécies de Leishmania, especialmente as do subgênero Viannia. O LRV1 é um vírus RNA de cadeia dupla (Totiviridae) descrita pela primeira vez em cepas de *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* da região amazônica. Dados anteriores demonstraram que cepas infectados com LRV1 provoca um perfil pró inflamatório mais Exacerbado parcialmente causada pela activação de receptores Toll like 3 (TLR3) através do cDNA viral. A presença de cepas infectadas pelo LRV1 já foi detectado em biópsia de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) da cidade de Caratinga, Minas Gerais. No entanto, não há informações da frequência de LRV1 para outras regiões endêmicas do Estado. O principal objetivo deste estudo é a prospecção da presença de LRV1 em cepas de *Leishmania braziliensis* isoladas de regiões no estado de Minas Gerais incluindo São João das Missões, onde são relatados muitos casos de CL na reserva indígena de Xacriabá e também formas atípicas de leishmaniose cutânea causadas por *L. braziliensis* que nunca antes haviam sido prospectadas para o LRV1. As reacções de PCR utilizaram iniciadores para a cápsideo viral e o cDNA de *L. guyanensis* (MHOM/BR /75/M4147) foi utilizado como controlo positivo. Foram prospectadas 41 cepas de *L. braziliensis* de várias regiões do Estado de Minas Gerais e alguns outros de outras regiões. A presença de LVR1 em parasitos isolados a partir de pacientes não foi observada. Esses resultados sugerem que a frequência de LRV1 em cepas de *L. braziliensis* parecem ser muito baixa na região Sudeste do Brasil.

Palavras Chave: *Leishmania braziliensis*; lrv1; Biologia molecular, Frequência, Lesões Atípicas

Abstract

Leishmania RNA virus (LRVs) are commonly found infecting Leishmania species, especially from the subgenus Viannia. LRV1 is a double-stranded RNA virus (Totiviridae) first described in *Leishmania guyanensis* and *Leishmania braziliensis* strains from the Amazon region. Previous reports have shown that *L. guyanensis* infected with LRV1 causes a higher pro-inflammatory profile partially caused by the activation of Toll like receptors 3 (TLR3) by the viral dsRNA. The presence of LRV1 infected strains was already detected in biopsy from patients with cutaneous leishmaniasis (CL) from Caratinga, Minas Gerais state. However, no information for LRV1 presence are available for other endemic regions of the State. The main objective of this study is to prospect the presence of LRV1 in Leishmania strains isolated from regions in the state of Minas Gerais, including São João das Missões, where many cases of CL are reported in the Indigenous reserve of Xacriabá and atypical forms of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis whose were never prospected for LRV1. The detection was by PCR reactions used primers for the viral capsid and cDNA from *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) was used as positive control. We prospected 41 strains of *L. braziliensis* from various regions of the Minas gerais State and a few others from other regions. The presence of LVR1 in parasites isolated from patients was not detected. Those results suggest that the frequency of LRV1 in *L. braziliensis* strains seems to be very low in the Southeast of Brazil.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; lrv1; Molecular biology, frequency, atypical lesions.

Lista de Figuras

FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTANDO O CICLO DE VIDA DE LEISHMANIA SPP.	- 16 -
FIGURA 2: DIFERENTES FORMAS DAS LESÕES NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.	- 19 -
FIGURA 3: ESQUEMA REPRESENTANDO A ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO LRV1.	- 24 -
FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ORIGENS E NÚMERO DOS ISOLADOS DE <i>L.</i> <i>BRAZILIENSIS</i> PROSPECTADAS PARA O LRV1 NESTE ESTUDO.	- 29 -
FIGURA 5: PROSPECÇÃO DE LRV1 EM CEPAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> PROCEDENTES DE FORMAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA ATÍPICAS E TÍPICAS..	- 33 -
FIGURA 6: PROSPECÇÃO DE LRV1 EM CEPAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> PROCEDENTES DE FORMAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA ATÍPICAS E TÍPICA..	- 34 -
FIGURA 7: PROSPECÇÃO DE LRV1 DE CEPA DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> (M15991) PROCEDENTE DE FORMA DE LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA.....	- 34 -
FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS ESTUDOS DE PROSPECÇÃO DE LRV1 REALIZADAS NA AMÉRICA DO SUL..	- 37 -

Lista de Tabelas

TABELA 1: CEPAS PROSPECTADAS PARA O LRV1.....	- 30 -
TABELA 2: PROSPECÇÃO DE LRV1 EM DIFERENTES CEPAS DE L. BRAZILIENSIS.....	- 35 -

Lista de Abreviaturas e Siglas

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: Ácido Ribonucleico de dupla fita

HSP70: Heat shock protein 70

KDa: Kilodalton

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Disseminada

LCDA: Leishmaniose Cutâneo Difusa Anérgica

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LT: Leishmaniose Tegumentar

LPG: Lipofosfoglicano

LV: Leishmaniose Visceral

ORF: Frame de leitura aberta

PI: Ponto isoelétrico

PSG: Promastigote secretory gel

RNA: Ácido Ribonucleico

SDS: Sodium dodecyl sulfate

ssRNA: Ácido Ribonucleico de fita Simples

Pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PH: Potencial hidrogeniônico

RDRP: RNA polimerase dependente de RNA

SB^v: Antimonial pentavalente

TLR3: Receptor do tipo toll 3

TVV: *Trichomonas vaginalis* Virus

WHO: World Health Organization “ Organização mundial da saúde. ”

Sumário

1	Introdução.....	- 14 -
1.1	As Leishmanioses	- 16 -
1.1.2	Leishmaniose Tegumentar	- 17 -
1.2	Vírus em protozoários e Leishmania Vírus	- 19 -
1.3	Estrutura e organização molecular do LRV1	- 22 -
1.4	LRV1 e patogenicidade na leishmaniose tegumentar.....	- 24 -
2	Objetivo.....	- 27 -
3	Material e Métodos	- 28 -
3.1	Cepas de <i>Leishmania</i> e condições de cultivo	- 28 -
3.2	Extração de DsRNA dos ácidos nucleicos totais	- 30 -
3.3	Tratamento do RNA total com DNase I.....	- 31 -
3.4	Síntese da fita de cDNA.....	- 31 -
3.5	Reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação do LRV1	- 31 -
4	Resultados.....	- 33 -
5	Discussão	- 36 -
6	Conclusões.....	- 42 -
	Referências.....	- 43 -

1 Introdução

Atualmente o conceito de parasitismo é entendido como sendo todas as variedades de associações interespecíficas com diferentes graus de interdependência entre os organismos. Dentre as muitas espécies consideradas parasitas, a classe Kinetoplastea, mais especificamente a ordem Trypanosomatida, possui diversos exemplos que tem despertado grande interesse da comunidade científica por se tratarem de importantes agentes infecciosos que acometem mamíferos, incluindo o homem. O estudo evolutivo dessa ordem é muito complexo, pois são organismos unicelulares dos quais faltam os indícios fósseis, obrigando os pesquisadores a recorrerem principalmente a evidências moleculares do processo evolutivo. Dentro desta ordem é possível observar que os indivíduos mais primitivos desenvolveram uma forma de vida livre. Posteriormente os Kinetoplastídeos desenvolveram o parasitismo destacando-se entre estes os Tripanossomatídeos. (SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006). Sabe-se que entre os gêneros que compõe a família Trypanosomatidae existem alguns que assumiram uma forma de vida digenética, transitando entre dois hospedeiros diferentes (STEVENS *et al.*, 2001). Estes incluem principalmente o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e várias espécies de *Leishmania*.

Um aspecto importante do ciclo de vida desses organismos é a alternância entre dois hospedeiros. A transição destes protozoários entre o vetor e o hospedeiro vertebrado (normalmente mamíferos) depende muito deste primeiro apresentar alto poder infeccioso e a capacidade de resistir ao complexo sistema imune dos vertebrados. Entre os parasitos de maior importância para os humanos pertencente a este grupo estão as leishmanias, que podem causar as leishmanioses (DE ASSIS *et al.*, 2012).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios que combinam cerca de 30 espécies, sendo aproximadamente 21 destas com importância médica e veterinária. (BATES, 2007; HERWALDT, 1999; IVES *et al.*, 2011). Estes parasitos possuem um complexo ciclo de vida digenético em que os insetos vetores são dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ROGERS & TITUS, 2003).

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* tem seu início quando as fêmeas de flebotomíneos de espécies vetoras exercem o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, ingerindo assim os macrófagos infectados com as formas amastigotas. Ao chegarem ao tubo digestório dos vetores, os macrófagos liberaram os parasitos e, em algumas horas já se encontram as formas flageladas, as promastigotas colonizando o intestino posterior (espécies do subgênero *Viannia*) e o intestino médio e anterior (no caso das espécies do subgênero *Leishmania*), presas por hemidesmossomos flagelares (DE ASSIS et al., 2012; LAINSON; RYAN; SHAW, 1987; SOARES et al., 2010)

As formas promastigotas procíclicas colonizam o intestino do vetor, escapam da matriz peritrófica e aderem a um receptor nas microvilosidades do epitélio intestinal, sendo essa etapa de suma importância para o parasito, evitando a sua excreção junto com o bolo alimentar (KAMHAWI et al., 2004). Posteriormente, ainda no vetor, as *Leishmanias* diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são infectantes para o hospedeiro vertebrado. Após a inoculação pelo vetor, as mesmas são fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos (PETERS et al., 2008). No interior dos vacúolos parasitóforos, as formas metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas, que se dividem binariamente. Estas rompem a célula parasitada e podem infectar outras células fagocitárias ou serem ingeridas por outro flebotomíneo reiniciando o ciclo do parasito (Figura 1) (KAYE; SCOTT, 2011)

Fig. 1

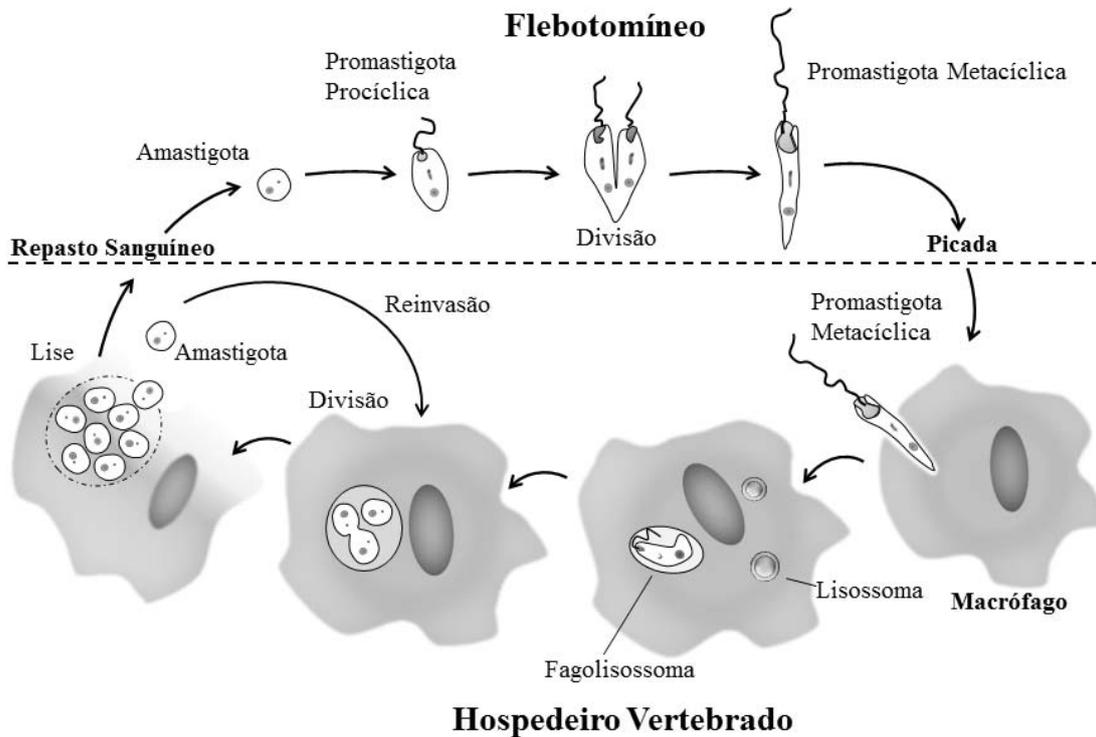


Figura 1: Esquema representando o ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de DE ASSIS *et al.*, 2012).

1.1 As Leishmanioses

As leishmanioses são um espectro de doenças parasitárias, que vão desde formas tegumentares até formas viscerais que podem ser fatais. As mesmas são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. De acordo, com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são doenças negligenciadas e cerca de 14 milhões de indivíduos podem estar infectados. A incidência é de cerca de 1,3 milhões de novos casos/ano com um número de mortes estimado em 30.000/ano para a forma visceral da doença. Estas informações podem estar subestimadas, pois em apenas 33 dos 98 países a notificação é compulsória. Aproximadamente 310 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a doença, sendo apenas 6 países responsáveis por 90% dos casos, entre eles o Brasil. (DESJEUX, 2004; WHO, 2015)

As manifestações clínicas da doença dependem da espécie do parasito, região, características imunológicas e genéticas do hospedeiro (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; KAYE; SCOTT, 2011). As leishmanioses podem ser divididas em dois grupos clínicos principais: A leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). A leishmaniose tegumentar pode, por sua vez, ser dividida em quatro formas clínicas: Cutânea (LC), cutânea difusa anérgica (LCDA), cutânea disseminada (LCD) e mucocutânea (LMC) que geram diferentes tipos de lesão (Figura 2) (ASHFORD, 2000; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

1.1.2 Leishmaniose Tegumentar

No Novo Mundo, essa forma pode ser causada tanto por parasitos do subgênero *Viannia* quanto por parasitos do subgênero *Leishmania*. As espécies do gênero *Viannia* incluem *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) utingensis*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) colombiensis*. As quatro ultimas estão com o status de espécie em discussão. As do subgênero *Leishmania* incluem *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, sendo que a ultima permanece em discussão quanto ao seu status de espécie (CUPOLILLO; BOITÉ; POROZZI, 2014; REITHINGER et al., 2007).

A LC caracteriza-se inicialmente pelo aparecimento, mais comumente no local da picada, de um nódulo ou pápula inflamatória gerada inicialmente pela migração de leucócitos, esta migração culmina em um posterior processo de necrose tecidual que acaba por resultar na formação de uma lesão ulcerada, normalmente com bordas elevadas e fundo granuloso e avermelhado que pode assumir dimensões variáveis e aparecer semanas, meses ou até mesmo anos após a infecção (ASHFORD, 2000).

Independentemente do curso e forma assumidos por estas lesões, a leishmaniose tegumentar pode gerar manifestações em mucosas decorrentes de metástases originadas de infecções pré-estabelecidas (leishmaniose

mucocutânea). Este tipo de manifestação caracteriza-se pelo surgimento tardio em relação a lesão primária e pela alta morbidade gerada pela destruição intensa das mucosas das regiões oral, nasal, faríngea e laríngea que podem causar sérias desfigurações. Este tipo de manifestação é comumente causado por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (ASHFORD, 2000; HERWALDT, 1999). *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* são os principais vetores de *L. braziliensis* no Brasil (GRIMALDI; TESH, 1993).

Um aspecto interessante observado em *L. braziliensis* é o aparecimento de lesões que não se enquadram na descrição clássica da ulcera leishmaniótica e tem sido caracterizadas como lesões atípicas (Figura 2) (BAPTISTA *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2009; LESCURE *et al.*, 2002) As lesões atípicas apresentam-se como verrucosas, crostosas, vegetativas e lesões lupóides e sua histopatologia é muito similar à observada em lesões típicas, o que indica que essas manifestações não são decorrentes da resposta imune do hospedeiro (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Entretanto, fatores ligados ao parasito não podem ser descartados. Recentemente, na terra indígena Xacriabá, no município mineiro de São João das Missões, pacientes com lesões atípicas causadas por *L. braziliensis* foram descritos. Algumas destas cepas apresentam o perfil de restrição para o gene hsp70 diferente daquele observado para a cepa referência de *L. braziliensis* (M2903)(QUARESMA, 2011). Entretanto, o sequenciamento demonstrou que embora tenham perfil distinto as mesmas foram identificadas como *L. brazilensis*. Ainda são incógnitas as razões para o aparecimento deste tipo de lesões.



Figura 2: Diferentes formas das lesões na leishmaniose tegumentar. (A) Forma cutânea típica (lesão clássica em moldura); (B) Forma Mucocutânea; (C,D,E,F) Formas atípicas; (QUARESMA, 2011)

Interessantemente algumas cepas de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, mais comumente as associadas com as formas metastáticas tegumentares, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis* podem estar infectadas com uma espécie de vírus de protozoários, o LRV1 (“*Leishmania* RNA vírus”) (STUART *et al.*, 1992; TARR *et al.*, 1988; WIDMER & DOOLEY, 1995). Em recente publicação a presença deste vírus em *L. guyanensis* foi associada à uma maior virulência da cepa (Ives *et al.*, 2011). Esses dados foram recentemente confirmados para várias cepas do subgênero *Viannia* principalmente *L. braziliensis* e *L. guyanensis* provenientes da região Norte do Brasil e isoladas de pacientes predominantemente apresentando lesões mucosas (CANTANHÊDE *et al.*, 2015). Entretanto, a presença do vírus LRV1 em parasitos isolados de pacientes com outras formas clínicas da LT como por exemplo a atípica ainda não foi explorada.

1.2 Vírus em protozoários e Leishmania Vírus

Os vírus são importantes ferramentas para nos ajudar a entender os mecanismos da regulação da expressão gênica e o processamento de RNA em células eucarióticas devido à necessidade da maquinaria celular para sua propagação. Estes organismos possuem genomas pequenos, poucos genes e a abundância de transcritos fornecem um material genético altamente

manipulável e rastreável na célula hospedeira a ser estudada (WANG; WANG, 1991; WIDMER *et al.*, 1989). Neste contexto, o encontro de LRV1 faz-se possível através de técnicas de biologia molecular.

A distribuição ampla de vírus em organismos indicava que existia também uma grande possibilidade de existência de partículas virais específicas em parasitos protistas. Em 1972 foi feita a primeira observação a partir de microscopia eletrônica de partículas similares a vírus em cepas de *Entamoeba histolytica*, no entanto, devido à falta de estudos subsequentes não é possível afirmar de forma assertiva que estas eram realmente vírus (DIAMOND; MATTERN; BARTGIS, 1972; MATTERN; DIAMOND; DANIEL, 1972). A primeira partícula identificada como vírus apareceu durante uma purificação de ácidos nucleicos em uma cepa de *Trichomonas vaginalis* (WANG; WANG, 1985). Inicialmente foi observada a presença de um ácido nucleico de aproximadamente 5,5 Kb que não era susceptível à DNase I e endonucleases de restrição. Além disso, este fragmento não amplificava após ação da DNA polimerase e não sofria ação da bleomicina A₂ (inibidor do metabolismo de DNA). Por outro lado, o mesmo se degradava na presença de NaOH 0,2M, ribonuclease T1 e ribonuclease A. Análises subsequentes caracterizaram o fragmento como RNA de dupla fita (dsRNA), que era estável (diferente de todos os outros ácidos nucleicos) em homogenados das culturas que continham todas as nucleases endógenas. Esta estabilidade, que indicava que a partícula era o RNA protegido de algum vírus, foi perdida ao tratar a cultura com SDS ou proteinase K. Experimentos de fracionamento celular demonstraram que o dsRNA estava associado à membrana. Após a separação utilizando um gradiente de cloreto de Césio foi possível, finalmente, observar pela primeira vez as partículas virais icosaédricas que foram nomeadas *Trichomonas vaginalis* Virus (TVV). Esta foi a primeira confirmação do encontro de um vírus em protozoários (WANG; WANG, 1985, 1991).

A identificação do primeiro vírus estimulou diversos pesquisadores a seguir o mesmo delineamento e identificar potenciais partículas virais em outros protozoários. Tarr *et al.*, (1988) foram os primeiros a descrever a presença de um RNA multicópia presente em citoplasma de *Leishmania guyanensis* (cepa MHOM/SR/81/CUMC1-1A) associado a partículas esféricas

que se mantinham presentes mesmo após a passagem da cepa pelo vetor. O mesmo grupo também sintetizou o cDNA para esse RNA e observou que este não se hibridizava em southern blotting com o DNA genômico do parasito, descartando assim a possibilidade de este ser um retrovírus. A partícula foi denominada LR1 e apesar de não ter sido completamente caracterizada foi a primeira descrição de uma partícula similar a vírus em um protozoário da família Trypanosomatidae.

A caracterização foi feita posteriormente por Widmer et al., (1989) que utilizaram 10 cepas de diferentes espécies de *Leishmania*, primeiramente investigando a presença de atividade de RNA polimerase nos extratos celulares. Apenas em duas cepas de *L. guyanensis* (WR677 e M4147) foi observada a síntese de fragmentos grandes (> 5Kb) de RNA. Após isso, foi feita a extração de ácidos nucleicos de todos os isolados. A eletroforese em gel de agarose mostrou a presença de um ácido nucleico de aproximadamente 6kb apenas nas cepas positivas para RNA polimerase. O Northern blotting utilizando o RNA total extraído das cepas WR677, M4147 e PH8 (como controle negativo) e os produtos da RNA polimerase de WR677 e M4147 como sonda estabeleceu a relação entre o genoma viral e o produto da RNA polimerase. Esta relação foi confirmada ainda por Southern blotting do DNA total do parasito tratado com EcoR1, confirmando que os produtos da RNA polimerase não eram transcritos do DNA do parasito. A presença do vírus foi confirmada utilizando microscopia eletrônica, detectando-se partículas esféricas ou icosaédricas similares a vírus de aproximadamente 30nm presentes na cepa WR677 e que estavam ausentes na cepa controle utilizada (RAI-5 clone 2). Estes dados confirmaram que o vírus de *Leishmania* possui RNA como material genético.

Entretanto não era conhecida a complexidade estrutural deste ácido nucleico (fita simples ou dupla). O mesmo se mostrou resistente a DNase, sensível a RNase na ausência ou presença de sal e se degradava em PH alto. Estes resultados indicavam que era um RNA viral de fita simples. Isto contrastava com a estabilidade não usual observada durante a extração dos ácidos nucleicos. Foi realizada também a digestão do RNA com uma nuclease em condições específicas para RNA de fita simples. A resistência do fragmento

sugeriu a presença de uma estrutura em fita dupla para o RNA do vírus que posteriormente seria denominado LRV1 (WIDMER et al., 1989). Weeks et al., (1992) demonstraram que existem partículas virais com ssRNA e outras, mais abundantes, que contém o dsRNA. A análise da sequência de cDNA de clones de LRV1 revelou que este ssRNA correspondia a fita positiva e continha um ORF homólogo a RNA polimerase dependente de RNA (RDRP) semelhante a presente em outros tipos de vírus. Entretanto, a organização dos genes ainda necessitava de maiores informações.

1.3 Estrutura e organização molecular do LRV1

O LRV1 é um vírus pertencente a família Totiviridae que possui um capsídeo viral icosaédrico ou esférico de aproximadamente 30-40 nm de diâmetro contendo um genoma de aproximadamente 5,3 kb composto de dsRNA e/ou ssRNA (STUART et al., 1992; TARR et al., 1988; WIDMER et al., 1989).

Um dos aspectos mais intrigantes da associação deste vírus com *Leishmania* é a questão da ancestralidade desta relação. Evidências importantes a este respeito indicam que esta associação seria bastante antiga indicando uma possível co-evolução (WIDMER; DOOLEY, 1995). Estudos filogenéticos analisando os LVR e as espécies de *Leishmania* mostraram que a infecção de *Leishmania* com LVR precede a divergência do gênero *Leishmania* em diferentes espécies e linhagens do Novo e Velho Mundo e parece ter evoluído junto com o hospedeiro (WIDMER; DOOLEY, 1995).

A análise da sequência dos LVRs observou diferenças importantes e estes foram divididos em duas categorias LVR1 para as cepas do Novo Mundo e LVR2 para as cepas do Velho Mundo. Os dois primeiros isolados do Novo Mundo contendo LVR1 tiveram suas sequências completas comparadas e observada similaridade de 76% nos 5.284 nucleotídeos sendo identificados como LVR1-1 para o vírus da cepa de *L. guyanensis* CUMC-1 e LVR1-4 para o vírus da cepa de *L. guyanensis* M4147 (SCHEFFTER et al., 1994). A revisão de nomenclatura realizada pelo Comitê Internacional em Nomenclatura de Vírus em 2014 passou a utilizar a designação de LVR1-

LgyCUMC-1 (espécie do vírus – espécie do hospedeiro/cepa) em substituição a LVR1-1 e LRV1-LgyM4147 para LVR1-4.

O LVR possui três regiões codificantes (OFR “open reading frames”). Foram observadas duas ORFs maiores e uma menor, todas estas presentes em janelas de leitura diferentes dentro da mesma fita. A fita complementar (negativa) apresenta diversos códons de parada dentro das regiões correspondentes às ORFs, que não possuem mais de 450 nucleotídeos. Por outro lado, a outra fita (positiva) é passível de ser traduzida como proteínas virais (STUART et al., 1992). Widmer, (1993) estudou o genoma do LRV1 através de técnicas de recircularização de DNA e um protocolo de ligação de extremidades 3' com 5'. Estes resultados foram comparados aos do sequenciamento de fragmentos sobrepostos de cDNA (STUART et al., 1992). De modo interessante, estas análises sugeriram que o cDNA do vírus possa possuir bordas coesivas. Embora o LRV1 possua três ORFs, a primeira cuja função foi elucidada foi a ORF3. Nesta região foram encontrados oito motivos de domínios C-terminal presentes em RDRPs (“RNA polimerases dependentes de RNA”). Estima-se que esta RDRP possua uma massa molecular predita de 98 kDa. Estas sequências já foram observadas na fita positiva de outros vírus similares (BRUENN, 1991).

A outra região cuja função foi desvendada foi a ORF2, que é correspondente ao capsídeo viral. Em outros vírus, é normalmente encontrada anteriormente às RDRPs (STRAUSS; STRAUSS, 1988; WICKNER, 1989). Esta sequência codifica uma proteína de aproximadamente 92 kDa que não teve nenhuma sequência similar quando comparada a outros vírus. Entretanto, estes autores sugeriram que poderia ser relacionado ao capsídeo, fato que foi posteriormente confirmado por Cadd & Patterson, (1994). A sobreposição de 71 nucleotídeos da ORF2 em relação a ORF3 sugere que exista em LRV1 um *frameshift* translacional +1 ou -1 (Figura 3), comum em outros vírus e usado para a síntese de uma proteína de fusão do tipo gag-pol maior, de aproximadamente 176 kDa e pI 7,6. Esta proteína estaria associada a partícula viral, e forneceria além da atividade de RDRP um sítio para ligação de RNAs (STUART et al., 1992).

Finalmente, a ORF1 produziria um polipeptídeo de 7,8 kDa sem similaridades com outras proteínas em nenhum banco de dados. No entanto, as análises em Pfold previram uma sequência secundária altamente conservada nessa região, sugestiva para codificação. Esta sequência poderia ser importante para a estabilização do RNA viral e também para iniciação da tradução dos RNAs virais que não possuem *caps*, diferente dos mRNAs eucarióticos, utilizando um mecanismo de ligação em sítios internos similar ao utilizado por piconarvirus (EVSTAFIEVA *et al.*, 1991; JACKSON; HOWELL; KAMINSKI, 1990; STUART *et al.*, 1992). O esquema da estrutura do LRV1 (ORFs 2 e 3) está representado abaixo (Figura 3).



Figura 3: Esquema representando a organização do genoma do LRV1. Adaptado de Hartley et al., (2012).

1.4 LRV1 e patogenicidade na leishmaniose tegumentar

Como é sabido, a espécie do parasito e características associadas ao hospedeiro vertebrado são importantes na determinação da progressão da infecção e a forma clínica da doença. Entretanto, é possível que outros fatores como a presença do LVR seja mais um aspecto de influência nesta complexa rede da interação parasito/hospedeiro.

O LRV1 foi prospectado em 71 isolados de espécies de *Leishmania* do Novo e do Velho mundo, sendo encontrando apenas em duas espécies do subgênero *Viannia*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (Guilbride et al 1992). Nos isolados foi relatada a existência de 12 vírus similares, sendo caracterizados como LRV1(1-12) por possuírem ligeira variação na região do capsídeo. Um aspecto interessante é que a maioria das cepas era da Amazônia. Até então não havia sido descrita a presença deste vírus em cepas de *Leishmania* provenientes de outra região do Brasil. A primeira descrição da

existência do LRV1 fora da Amazônia, foi em amostras de lesões de pacientes de Caratinga-MG (OGG *et al.*, 2003) não sendo possível avaliar a correlação entre a presença do vírus e a gravidade da infecção. Entretanto, após este estudo não foi relatada a presença deste vírus em outras regiões de Minas Gerais possivelmente por falta de estudos de prospecção.

A possível influência da presença do vírus na patologia da doença no hospedeiro vertebrado foi aventada já nos primeiros estudos de detecção do vírus em espécies de *Leishmania* (GUILBRIDE; MYLER; STUART, 1992). Entretanto, o primeiro estudo que forneceu indícios importantes sobre a associação do LRV1 com virulência e ocorrência de leishmaniose mucocutânea foi o de Ives *et al.*, (2011). Neste trabalho foi observada uma produção significativamente maior de citocinas e quimiocinas em camundongos infectados com a cepa viral de *L. guyanensis*. Esta maior produção seria dependente de TLR3 (“Toll-like receptor”) ativado pelo dsRNA do vírus. Estes dados foram recentemente confirmados utilizando outros marcadores e cepas pelo mesmo grupo (IVES *et al.*, 2014). Entretanto, este número limitado de cepas ainda não permitiam uma correlação direta entre o LRV1 e o desenvolvimento de formas cutâneas mais graves. Estes estudos foram realizados em camundongos, porém estes aspectos ainda continuavam desconhecidos em humanos.

Estes dados foram diferentes dos relatados por Pereira *et al.*, (2013) que estudaram 48 amostras de biópsias de casos de leishmaniose cutânea (32), mucosa (9), mucocutânea (2) e cicatrizes (5). Quarenta amostras eram provenientes do estado do Rio de Janeiro e oito da Bacia Amazônica. Nenhuma das cepas do Rio de Janeiro estavam infectadas com o LRV1 e apenas duas cepas do Norte tinham o vírus. Provavelmente as diferenças na virulência eram cepa-específicas e já indicavam que a frequência do LRV1 no Sudeste deveria ser baixa quando comparada à da Bacia Amazônica.

Mais recentemente, trabalhos com LRV1 detectados em pacientes da região Amazônica trouxeram mais informações sobre este aspecto. Indícios importantes foram preliminarmente identificados em um estudo transversal

onde 70,3 % de pacientes com leishmaniose mucocutânea apresentaram LRV1 nas biópsias (Ito *et al.*, 2015). Entretanto, a confirmação desta causalidade foi recentemente estabelecida, onde foi observado que os pacientes que apresentaram o LRV1 em suas biópsias tinham 2,93 vezes maior chance de desenvolver a forma mucocutânea. Neste estudo, a maioria dos pacientes estavam infectados com *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (CANTANHÊDE *et al.*, 2015).

Considerando que a leishmaniose tegumentar no Brasil e em Minas Gerais tem grande impacto na saúde pública e que muito pouco se conhece sobre o impacto da presença do LRV1 na progressão da infecção por *Leishmania braziliensis* nosso estudo se propôs prospectar o vírus LRV1 em cepas procedentes em sua maioria do Estado de Minas Gerais. Foram utilizadas cepas isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas visando avaliar a influência da presença do LRV na infecção por *Leishmania braziliensis*, que é a espécie mais prevalente nos casos humanos de leishmaniose tegumentar no Brasil.

2 Objetivo

- Prospectar o LRV1 em cepas de *L. braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar Avaliar a influência do LRV1 na manifestação clínica da leishmaniose tegumentar.

3 Material e Métodos

3.1 Cepas de *Leishmania* e condições de cultivo

As cepas de referência da Organização Mundial de Saúde: *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) como controles negativo e positivo, respectivamente. Foram utilizadas 41 cepas de *L. braziliensis*, em sua maioria provenientes de diversas regiões de Minas Gerais, Brasil, isoladas de pacientes apresentando diferentes formas clínicas de leishmaniose tegumentar (Figura 4) (Tabela 1). Estas amostras são procedentes de bancos de cepas dos nossos colaboradores: Dra. Maria Norma Melo (UFMG), Dra. Célia Maria Gontijo (CPqRR-FIOCRUZ/MG), Dr. Felipe Passero (USP); Dra. Valéria Borges (CPqGM/FIOCRUZ). As cepas de referência da Organização Mundial de Saúde: *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) foram utilizadas como controles negativo e positivo da presença do LRV1, respectivamente. Foi incluída no estudo uma cepa de *L. braziliensis* isolada de flebotomíneo no estado do Pará (I /BR/ /M8401)

As formas promastigotas foram cultivadas estufa BOD a 25°C±1°C em meio definido 199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL), streptomina (50 µg/mL), glutamina (12,5mM), Hepes (40 mM), adenina (0,1 mM) e hemina (0,0005%), pH 7,4 (SOARES et al., 2002).

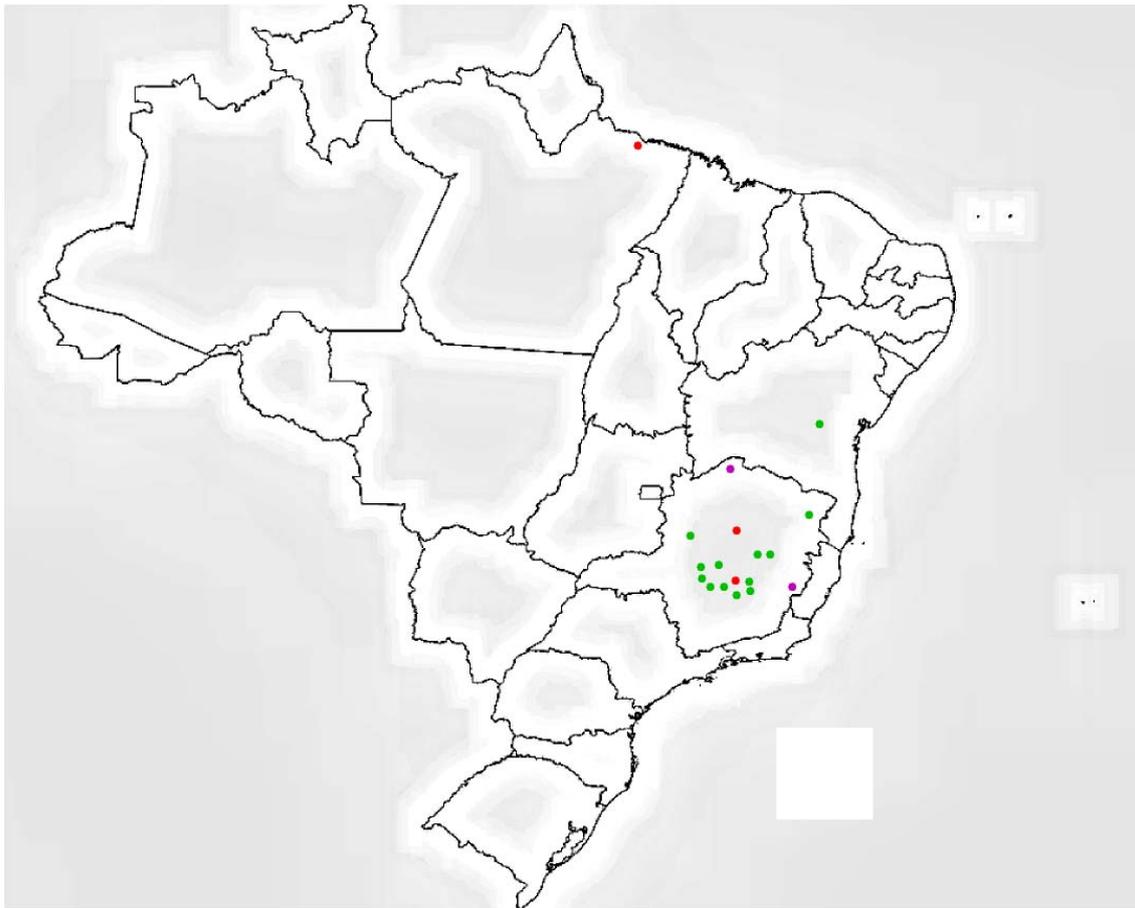


Figura 4: Distribuição geográfica das origens e número dos isolados de *L. braziliensis* prospectadas para o LRV1 neste estudo. Um círculo verde indica cidades em que no mínimo uma cepa foi prospectada neste estudo, um círculo vermelho indica que mais de uma cepa foi prospectada na região indicada e os círculos roxos representam os locais de maior interesse, Caratinga/MG (Leste de MG) e São João das Missões (Norte de MG) *- Cepa com município de origem não especificado. Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 1: Cepas prospectadas para o LRV1.

Cepa	Origem	Espécie	Tipo de lesão
1. RR30	Araçuaí/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
2. M15991	Belém/PA	<i>L. braziliensis</i>	Mucocutânea
3. M8401	Belém/ PA	<i>L. braziliensis</i>	*
4. MG3	Belo Horizonte	<i>L. braziliensis</i>	Típica
5. BH453	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
6. BH450	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
7. BH456	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
8. BH454	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
9. BH455	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
10. BH451	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
11. BH457	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
12. BH452	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
13. BH17	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
14. BH459	Caratinga/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
15. RR41	Diamantina/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
16. RR48	Esmeraldas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
17. 404	Jaboticatubas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
18. M2902	João Pinheiro/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
19. 350	Lagoa Santa/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
20. 376	Martinho Campos/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
21. RR49	Pará de Minas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
22. RR56	Pitangui/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
23. RR45	Rib. Neves/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
24. RR43	Rio Vermelho/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
25. 275	Sabará/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
26. RR42	Santa Luzia/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
27. 417	Santa Luzia/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
28. MG23	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Atípica
29. MG27	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Atípica
30. MG16	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
31. MG24	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Atípica
32. 330	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Atípica
33. MG20	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Atípica
34. RR71	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
35. MG27	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
36. 340	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
37. 390	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
38. 416	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
39. Luís R.F.	Não especificada/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
40. Adilson	Não especificada/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Típica
41. BA788	Não especificada/BA	<i>L. braziliensis</i>	Típica

*Cepa isolada de Flebotomíneo.

3.2. Extração de DsRNA dos ácidos nucleicos totais

As formas promastigotas em fase estacionária, com aproximadamente 1×10^8 células/mL, foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min., lavados com PBS 1x (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, e pH de 7.4) e ressuspensos em reagente TRIZOL[®] (Invitrogen). Para a extração do RNA foi utilizado o método do Trizol seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante com exceção do passo de lavagem em álcool 70%, onde foram realizadas duas lavagens ao invés de uma como recomendada. Esta modificação propiciou a obtenção de amostras de RNA com menos contaminantes orgânicos. Após as lavagens o RNA foi ressuspensionado em água, aquecido a 60°C por 15 min e quantificado por espectrofotometria a 280 nm.

3.3. Tratamento do RNA total com DNase I

O RNA total extraído foi tratado utilizando DNase I - RNase-free (Invitrogen), incubando-se 10 µg do RNA extraído com 2U da enzima por 30 min. a 37°C e posteriormente dosado novamente em nanodrop. Este método foi realizado para eliminar qualquer DNA genômico contaminante que poderia gerar reações falso-positivas no PCR utilizando o gene da β-tubulina.

3.4 Síntese da fita de cDNA

O RNA tratado foi utilizado para a síntese da fita de DNA complementar com o kit “*Super Script III First-strand Synthesis System*” (Invitrogen) seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. Em cada síntese foi utilizada 1,5 µg de RNA e os hexâmeros aleatórios como iniciadores inespecíficos.

3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação do LRV1

Para a identificação do LRV1 foi utilizado o PCR com os seguintes iniciadores para a região do capsídeo do vírus desenvolvido pelo nosso colaborador Dr. Stephen Beverley (WASHU/USA):

Iniciador 1 (SMB4647): 5'-
TB(GTC)R(AG)TW(AT)GCR(AG)CACAGTGAY(TC)GAAGG-3'

Iniciador 2 (SMB4648): 5'-
CW(AT)ACCCAR(AG)W(AT)ACCAB(TGC)GGB(TGC)GCCAT-3'

Estes iniciadores foram desenhados a partir das sequências do LRV das seguintes cepas de *L. guyanensis*: LRV1-Lgy-CUMC1-1A, LRV1-Lgy-M4147, *L. braziliensis*: LRV1-Lbr-LEM2700, LRV1-Lbr-LEM2780, *L. major* LRV2-Lmj-5ASKH e *L. aethiopica* LRV2-Lae- L494. A amplificação deste gene permite a identificação de uma banda de 496 pb.

Como controle positivo da qualidade do cDNA utilizamos uma PCR dirigida ao gene da β-tubulina, permitindo a detecção de um fragmento de 335 pb.

Iniciador 1 (SMB2109): 5'- ACTGGATCCATGCGTGAGATCGTTTCCTGCC-3'

Iniciador 2 (SMB2110): 5'-GACAGATCTCATCAAGCACGGAGTCGATCAGC-3'

As condições termais para ambas as reações foram: 94°C-3 min, 94°C-1 min, 50°C-1 min, 72°C-1 min (30 ciclos) seguido de extensão à 72°C por 5 min.

Após o PCR, o material amplificado foi submetido a eletroforese em gel de Agarose 1%.

4 Resultados

As 37 cepas de *L. braziliensis* foram prospectadas para o vírus LRV1. Conforme esperado, o vírus foi detectado no controle positivo (*L. guyanensis* cepa M4147). No controle é possível observar a banda específica para o capsídeo viral de 496 pb. Por outro lado, o vírus não foi identificado no controle negativo (*L. braziliensis* M2903) e em nenhuma das 37 cepas analisadas (Figuras 5 a 7). A presença de amplificação do fragmento correspondente ao gene controle da β -Tubulina (396 pb) comprova a qualidade do cDNA utilizado. Abaixo, três géis representativos com algumas cepas típicas e atípicas (Figuras 5 e 6) e mucucutânea (Figura 7). Estes resultados estão representados na Tabela 2.

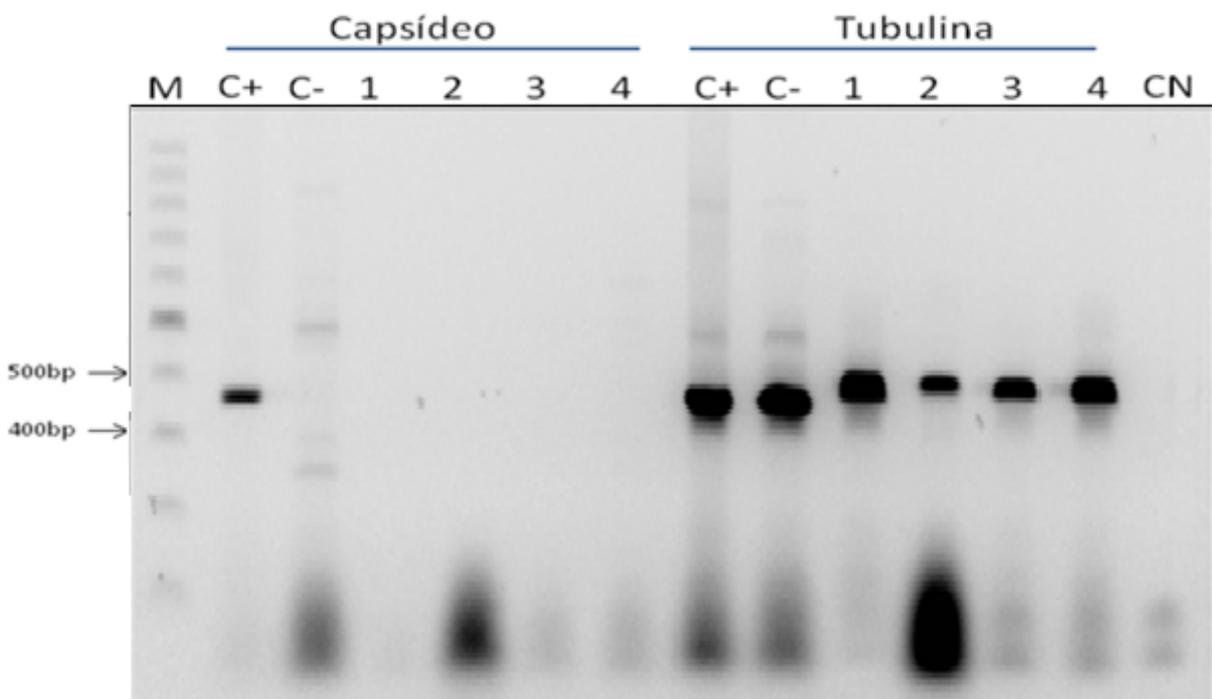


Figura 5: Prospecção de LRV1 em cepas de *L. braziliensis* procedentes de formas de leishmaniose cutânea atípicas e típicas. Legenda: M, marcador de peso molecular, C+, controle positivo (*L. guyanensis* M4147); C-, controle negativo (*L. braziliensis* M2903); canaletas 1 e 2 (MG23 e MG27, atípicas), canaletas 3 e 4 (MG3 e MG16, típicas); CN, controle negativo da reação.

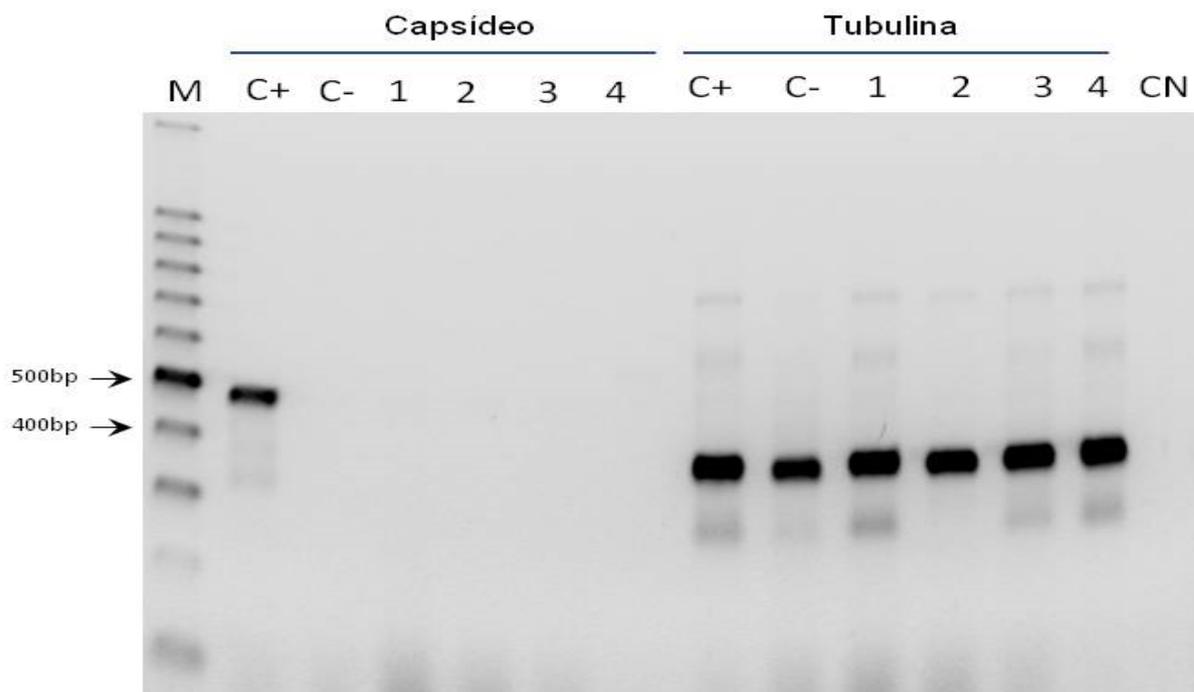


Figura 6: Prospecção de LRV1 em cepas de *L. braziliensis* procedentes de formas de leishmaniose cutânea atípicas e típica. Legenda: M, marcador de peso molecular, C+, controle positivo (*L. guyanensis* M4147); C-, controle negativo (*L. braziliensis* M2903); canaletas 1, 2 e 3 (MG24, 330 e MG20, atípicas), canaleta 4 (MG16, típica); CN, controle negativo da reação.

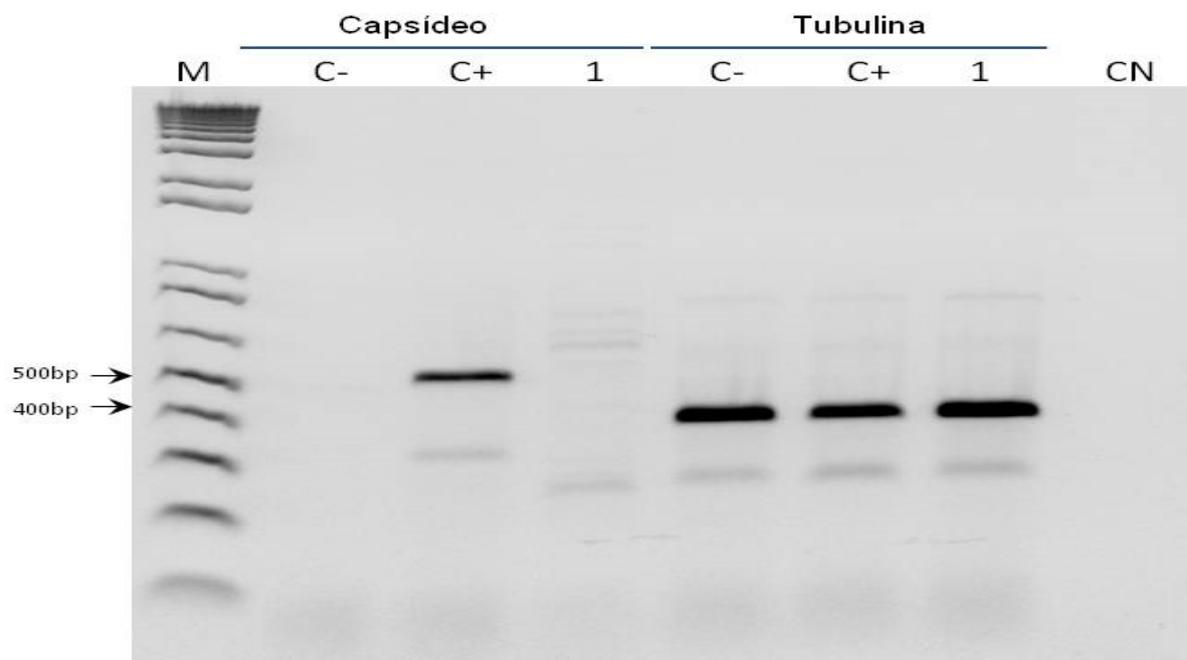


Figura 7: Prospecção de LRV1 de cepa de *L. braziliensis* (M15991) procedente de forma de leishmaniose mucocutânea. Legenda: M, marcador de peso molecular, C+, controle positivo (*L. guyanensis* M4147); C-, controle negativo (*L. braziliensis* M2903); canaleta 1 (15991, mucocutânea); CN, controle negativo da reação.

Tabela 2: Prospecção de LRV1 em diferentes cepas de *L. braziliensis*.

Cepa	Origem	Espécie	LRV1
1. RR30	Araçuaí/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
2. M15991	Belém/PA	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
3. M8401	Belém/ PA	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
4. MG3	Belo Horizonte	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
5. BH453	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
6. BH450	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
7. BH456	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
8. BH454	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
9. BH455	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
10. BH451	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
11. BH457	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
12. BH452	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
13. BH17	Caratinga/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
14. BH459	Caratinga/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
15. RR41	Diamantina/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
16. RR48	Esmeraldas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
17. 404	Jaboticatubas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
18. M2902	João Pinheiro/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
19. 350	Lagoa Santa/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
20. 376	Martinho Campos/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
21. RR49	Pará de Minas/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
22. RR56	Pitangui/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
23. RR45	Rib. Neves/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
24. RR43	Rio Vermelho/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
25. 275	Sabará/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
26. RR42	Santa Luzia/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
27. 417	Santa Luzia/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
28. MG23	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
29. MG27	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
30. MG16	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
31. MG24	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
32. 330	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
33. MG20	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
34. RR71	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
35. MG27	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
36. 340	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
37. 390	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
38. 416	São João das Missões/MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
39. Luís R.F.	Não especificada/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
40. Adilson	Não especificada/ MG	<i>L. braziliensis</i>	Negativo
41. BA788	Não especificada/BA	<i>L. braziliensis</i>	Negativo

* Cepa Isolada de Flebotomíneo

5 Discussão

Os parasitos do subgênero *Viannia*, só encontrado no Novo Mundo, causam a leishmaniose tegumentar, infectam uma variedade de animais silvestres incluindo roedores, carnívoros, edentados e primatas. Em nosso estudo focalizamos a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* que é a mais frequentemente encontrada parasitando o homem, causando neste hospedeiro lesões que podem ser simples ou múltiplas, típicas ou atípicas, com caráter extensivo e tendência a produzir metástases nasobucofaríngeas (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987)

Os fatores de risco relacionados ao processo de disseminação do parasito são pouco conhecidos. A espécie *L. braziliensis* tem um número elevado de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) e em conjunto com a perda de alguns genes, podem ser fatores que contribuem para o seu tropismo à disseminação para as mucosas e a patogenicidade aumentada em relação às outras espécies (ROGERS et al., 2011). Embora estudos sobre aspectos imunológicos do hospedeiro e genéticos dos parasitos tenham mostrado uma associação com o potencial metastático, ainda não existe um consenso entre os pesquisadores sobre este fenômeno. Este conflito de opiniões evidencia que o processo possivelmente é multifatorial e depende das interações complexas entre o parasito, hospedeiro e o ambiente. Entre estes fatores foi observado que a presença de um patógeno (LRV) em cepas de *Leishmania* pode influenciar o curso da infecção causada por este parasito. Estudos realizados em modelo animal mostraram que as cepas de *L. guyanensis* infectadas por vírus causavam metástases nos hamsters diferentemente daquelas sem a infecção viral (IVES et al., 2011). Um aspecto interessante deste estudo foi que a cepa contendo o vírus foi mais pró-inflamatória atuando na ativação de TLR3 resultando numa maior indução de citocinas, quimiocinas e uma lesão exacerbada.

Os estudos sobre a presença e distribuição do LRV no Brasil e no restante da América do Sul são escassos (Figura 8) e a primeira detecção do vírus foi realizada em amostras provenientes de biópsias de pacientes no município de Caratinga, MG (OGG et al., 2003). Somente nos últimos anos, houve um interesse maior em se estudar o LRV1 em cepas do subgênero

Viannia e sua correlação com a patogenicidade em amostras provenientes de pacientes com as formas cutâneas e mucocutâneas.

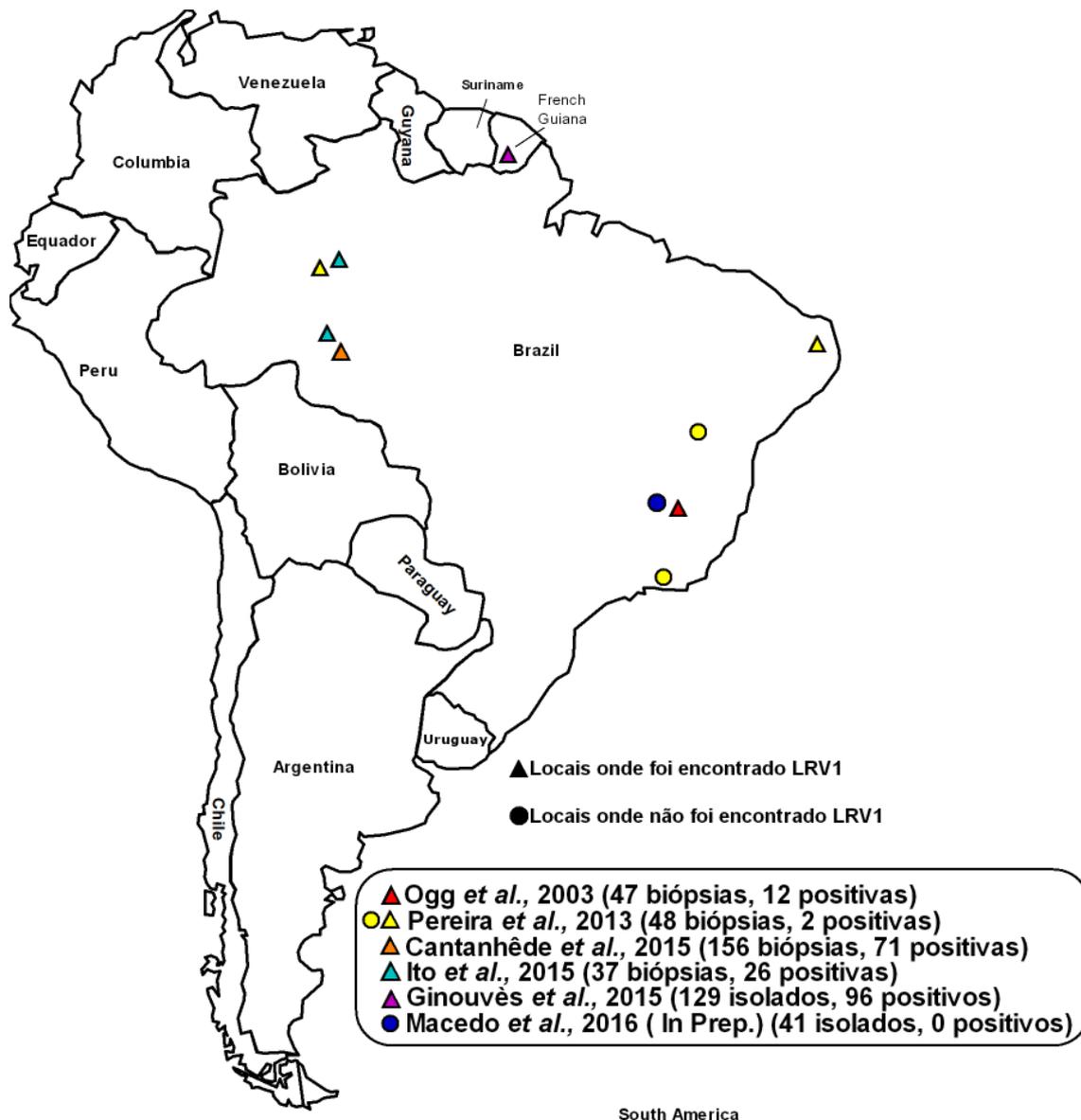


Figura 8: Distribuição geográfica dos estudos de prospecção de LRV1 realizadas na América do Sul.
FONTE: Elaborada pelo autor.

Neste trabalho, incluímos cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com manifestações clínicas atípicas que ainda não haviam sido pesquisadas para a presença do LRV1. Vale salientar que este é o primeiro trabalho no Brasil que realizou a prospecção do vírus em cepas isoladas em cultura e não de material procedente de biópsias.

Os nossos resultados indicam que o LRV1 tem baixa prevalência em Minas Gerais pois nas 41 amostras avaliadas não foi detectada a presença do vírus em nenhuma delas.

O estudo de Pereira et al., (2013), usando biópsias também mostrou a ausência do LRV1 em amostras de pele de pacientes infectados por *L. braziliensis*. Os autores utilizaram 40 amostras de fragmentos de biópsia congelados provenientes do estado do Rio de Janeiro e 8 das regiões Norte/Nordeste. Nenhuma das amostras do Sudeste foi positiva para o LRV1, em contraste, 25% (2/8) das amostras provenientes do Norte/Nordeste, ambas provenientes de lesões cutâneas localizadas e típicas causadas por *L. guyanensis*, foram positivas para o LRV1. Estes resultados utilizando um número significativo de amostras não estabeleceram uma relação direta entre o LRV1 e formas mais graves de leishmaniose. Além disso, estes dados fornecem indícios importantes de que a frequência do LRV1 no Sudeste seria baixa. Entretanto, os estudos tem mostrado dados controversos no que diz respeito a correlação entre a presença do LRV e a severidade da infecção.

Mais recentemente, os resultados publicados por Ito *et al.*, (2015), utilizando biópsias de pacientes com leishmaniose mucocutânea do Norte do Brasil mostraram a presença do LRV1 em 70,3% (26/37) dos indivíduos. Uma limitação deste estudo é que foram utilizadas somente amostras de pacientes apresentando uma mesma forma clínica não sendo avaliada a presença do vírus em formas cutâneas simples. Após a tipagem das 37 amostras 30 eram de *L. braziliensis*, 5 de *L. guyanensis* e dois com ambas as espécies. Um ponto importante destes resultados é que a frequência do LRV1 varia de acordo com a região do país e parece ser maior na região Amazônica.

Esta hipótese foi fortalecida após o trabalho de Ginouvès *et al.*, (2015), que prospectou isolados de *L. guyanensis* e *L. braziliensis* da Guiana Francesa e obteve uma frequência próxima a 74% para todos os isolados (55% para *L. braziliensis*). Estas publicações corroboram com os dados anteriores sobre o LRV1 que utilizaram somente amostras da região Amazônica (ADAUI et al., 2015; IVES et al., 2011; TARR et al., 1988).

Recentemente, outro trabalho, desta vez mais completo, foi realizado na região Norte também com amostras de lesão de pacientes com formas cutâneas e mucocutâneas (CANTANHÊDE et al., 2015). Este estudo foi mais abrangente utilizando 156 pacientes (121 com *L. braziliensis*) da cidade de

Porto Velho, obteve um total de 67 amostras positivas (45,59%). Neste trabalho, foi observada uma maior chance (2.93 vezes) de desenvolvimento de formas mucocutâneas em pacientes com cepas infectadas com LRV1. Este trabalho representa um marco importante no estabelecimento desta correlação, uma vez que utilizou um grande número de amostras confirmando o sugerido por Ives et al. (2011). Este dado demonstra mais uma vez a alta frequência do LRV1 na Região Amazônica.

Em nosso estudo as cepas provenientes de Minas Gerais representam o grupo mais significativo de amostras e sua distribuição contempla grande parte do estado (Figura 4). Vale ressaltar o grande número de cepas (9) procedentes da região norte (São João das Missões) e leste (9 de Caratinga). A inclusão de isolados de Caratinga foi importante devido à primeira descrição do LRV1 em pacientes ter sido desta área (OGG et al., 2003). Nossos dados utilizando em sua maioria cepas de Minas Gerais confirmam os dados de Pereira *et al.*, (2011) que não detectaram a presença do LRV1 em cepas do Rio de Janeiro. Estes dados indicam que a frequência do vírus no Sudeste deve ser baixa ou nula quando comparada às frequências observadas nos estudos do Norte (CANTANHÊDE et al., 2015; ITO et al., 2015).

Por outro lado, estes resultados contrastam com o primeiro trabalho que detectou a presença do LRV1 em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea em Caratinga (OGG et al., 2003). Neste estudo, os autores prospectaram 47 amostras e obtiveram 12 positivas para o LRV1 (25,5%). Entretanto, utilizando parasitos isolados de pacientes desta região, não detectamos a presença do LRV1. Duas hipóteses poderiam explicar estas diferenças: (1) as 9 cepas prospectadas realmente não possuem o vírus; (2) o material procedente de biópsia poderia conter outros vírus da família Totiviridae e apresentar reação cruzada. Já foi observado a presença de outros Totiviridae em fungos (leveduras) que são facilmente detectados utilizando os iniciadores utilizados neste estudo (BRUENN, 1991). A maioria dos pacientes de Caratinga são de trabalhadores rurais e a existência de infecções secundárias oportunistas não pode ser descartada. Esta hipótese merece ser melhor estudada, inclusive ressaltando a necessidade de se isolar o parasito das amostras biopsiadas. Isto garantiria a pureza da amostra e evitaria reações

cruzadas com outros Totiviridae. Além disso, as cepas isoladas não poderiam perder o LRV1, uma vez que estudos anteriores demonstraram ser esta infecção estável dentro do parasito (RO; SCHEFFTER; PATTERSON, 1997). Vale ressaltar também o fato de que nenhuma das cepas nossas e de Ogg et al., (2003) provenientes de Caratinga eram causadoras de lesões mucocutâneas. Este dado reforça a ideia de que no Sudeste a presença do LRV1 não estaria diretamente relacionada às formas mais graves e provavelmente a virulência seria cepa-específica. O oposto também ocorre. Um exemplo interessante é a cepa 15991, procedente de lesão mucocutânea proveniente da região norte (Pará) e em nossas análises ela foi negativa para o LRV1.

Este é o primeiro estudo que prospectou LRV1 em cepas que causaram lesões atípicas. As cepas MG23, MG24, 330, MG20, MG27 de *L. braziliensis* são provenientes do povoado Indígena Xacriabá, situado na cidade de São João das Missões, MG. As mesmas também foram negativas, reforçando a ideia de que outros mecanismos seriam responsáveis por este tipo de lesão. Estes poderiam incluir o status imune do hospedeiro e fatores ligados ao parasito. Evidências importantes sobre esta última é o diferente padrão genético das cepas após perfil de restrição do gene da HSP70 (QUARESMA, 2011).

Do que foi exposto, nossos resultados indicam que as cepas de *L. braziliensis* de Minas Gerais não estão infectadas pelo LRV1, ou possuem baixas frequências comparadas às cepas do Norte. Deste modo, nesta região, não foi possível observar a relação entre as formas clínicas e a presença do LRV1. A ocorrência de diferentes formas clínicas é provavelmente causada por outros fatores relacionados as características intrínsecas dos parasitos dos hospedeiros bem como de suas interações.

A real frequência e distribuição do LRV1 ainda permanece uma grande incógnita no Sudeste e em outras importantes regiões endêmicas de leishmaniose tegumentar no Brasil. Mais cepas provenientes de pacientes com variadas formas clínicas da doença devem ser isoladas e avaliadas quanto a

presença de *Leishmania* vírus na tentativa de se conhecer melhor os aspectos relacionados a patogenia da infecção.

6 Conclusões

1. A frequência do LRV1 nas cepas prospectadas foi nula e reforça sua baixa frequência no Sudeste.
2. Os parasitos isolados de pacientes apresentando formas atípicas não apresentaram o LRV1.
3. A ausência do LRV1 em isolados de pacientes apresentando diferentes formas clínicas indica que outros fatores influenciam na diversidade da manifestação clínica da leishmaniose tegumentar
4. Não foi possível avaliar a relação entre as formas clínicas e a presença do LRV1.

Referências

ADAUI, V. et al. Association of the endobiont doubled-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure of human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–32, 2015.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269–1281, 2000.

BAPTISTA, C. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 317–22, abr. 2009.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BRUENN, J. A. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 2, p. 217–26, 25 jan. 1991.

CADD, T. L. & PATTERSON, J. L. Synthesis of viruslike particles by expression of the putative capsid protein of *Leishmania* RNA virus in a recombinant baculovirus expression system. **Journal of virology**, v. 68, n. 1, p. 358–65, 1994.

CANTANHÊDE, L. M. et al. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004079, 2015.

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; POROZZI, R. Considerações sobre a taxonomia do gênero *leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Eds.). **Leishmanioses do continente Americano**. 22. ed. Rio de Janeiro:

Editora Fiocruz, 2014. p. 512.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAMOND, L. S.; MATTERN, C. F.; BARTGIS, I. L. Viruses of Entamoeba histolytica. I. Identification of transmissible virus-like agents. **Journal of virology**, v. 9, n. 2, p. 326–41, fev. 1972.

EVSTAFIEVA, A. G. et al. A complex RNA sequence determines the internal initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 3, p. 665–71, 11 fev. 1991.

GINOUVÈS, M. et al. Prevalence and Distribution of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania Parasites from French Guiana. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 23 nov. 2015.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUILBRIDE, L.; MYLER, P. J.; STUART, K. D. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different Leishmania species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, p. 101–104, 1992.

GUIMARÃES, L. H. et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of Leishmania braziliensis in the state of Bahia, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.

103, n. 7, p. 712–5, jul. 2009.

HARTLEY, M.-A. et al. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 99, 2012.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

ITO, M. M. et al. Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 5, p. 533–540, 2015.

IVES, A. et al. Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6018, p. 775–778, 2011.

IVES, A. et al. MyD88 and TLR9 Dependent Immune Responses Mediate Resistance to Leishmania guyanensis Infections, Irrespective of Leishmania RNA Virus Burden. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96766, 2014.

JACKSON, R. J.; HOWELL, M. T.; KAMINSKI, A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. **Trends in biochemical sciences**, v. 15, n. 12, p. 477–83, dez. 1990.

KAMHAWI, S. et al. A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 329–41, 29 out. 2004.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, ago. 2011.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421–4, jan. 1987.

LESCURE, F. X. et al. [Atypical cutaneous leishmaniasis]. **Presse médicale (Paris, France : 1983)**, v. 31, n. 6, p. 259–61, 16 fev. 2002.

MATTERN, C. F.; DIAMOND, L. S.; DANIEL, W. A. Viruses of Entamoeba histolytica. II. Morphogenesis of the polyhedral particle (ABRM 2 leads to HK-9) leads to HB-301 and the filamentous agent (ABRM) 2 leads to HK-9. **Journal of**

virology, v. 9, n. 2, p. 342–58, fev. 1972.

MONTENEGRO-IDROGO, J. J. et al. Leishmaniasis mucocutânea em un paciente con infección por VIH. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 31, n. 5, p. 610–614, 2014.

OGG, M. M. et al. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 3, p. 309–313, 2003.

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 665–667, 2013.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–4, 15 ago. 2008.

QUARESMA, P. F. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores, 2011. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte**, v. 1, p. 167, 2011.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RO, Y. T.; SCHEFFTER, S. M.; PATTERSON, J. L. Hygromycin B resistance mediates elimination of Leishmania virus from persistently infected parasites. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 8991–8998, 1997.

ROGERS, K. A. & TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite immunology**, v. 25, n. 3, p. 127–34, 2003.

ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res.**, v. 21, p. 2129–2142, 2011.

SCHEFFTER, S.; WIDMER, G.; PATTERSON, J. L. Complete Sequence of

Leishmania RNA Virus 1-4 and Identification of Conserved Sequences. **Virology**, v. 199, n. 2, p. 479–483, 1994.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–51, maio 2004.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.

SOARES, R. P. et al. Differential midgut attachment of Leishmania (Viannia) braziliensis in the sand flies Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani and Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 439174, jan. 2010.

SOARES, R. P. P. et al. Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 121, n. 2, p. 213–24, maio 2002.

STEVENS, J. R. et al. **The molecular evolution of trypanosomatidae** *Advances in Parasitology*, 2001.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. Evolution of RNA viruses. **Annual review of microbiology**, v. 42, p. 657–83, jan. 1988.

STUART, K. D. et al. Molecular organization of Leishmania RNA virus 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8596–600, 1992.

TARR, P. I. et al. LR1: a candidate RNA virus of Leishmania. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9572–5, 1988.

WANG, A. L.; WANG, C. C. A Linear Double-stranded RNA in Trichomonas vaginalis. **The Journal of Biological chemistry**, v. 260, n. 84, p. 3697–3702, 1985.

WANG, A. L.; WANG, C. C. Viruses of parasitic protozoa. **Parasitology today**, v. 7, n. 14, p. 76–80, 1991.

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

WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 11 dez. 2015.

WICKNER, R. B. Yeast virology. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 11, p. 2257–65, set. 1989.

WIDMER, G. et al. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 15, p. 5979–5982, 1989.

WIDMER, G. RNA circularization reveals terminal sequence heterogeneity in a double stranded RNA virus. **Virology**, v. 1, n. 1, p. 11–15, 1993.

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