

*Lorena Christine Ferreira da Silva*

**Mimivírus: um vírus gigante de DNA**

*Belo Horizonte  
2011*

*Lorena Christine Ferreira da Silva*

## **Mimivírus: um vírus gigante de DNA**

*Monografia apresentada como requisito de avaliação do curso de Especialização em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.*

*Orientador: Jônatas Santos  
Abrahão*

*Belo Horizonte  
2011*

Silva, Lorena Christine Ferreira da.

Mimivírus : um vírus gigante de DNA [manuscrito] / Lorena Christine Ferreira da Silva. - 2011.

41 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Jônatas Santos Abrahão.

Monografia apresentada como requisito de avaliação do curso de Especialização em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

1. Mimivírus. 2. Genomas - Teses. 3. Pneumonia - Teses. 4. Evolução (Biologia) - Teses. 5. Microbiologia - Teses. I. Abrahão, Jônatas Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.8

*À minha família e amigos...*

*“... Há certas horas que só queremos a mão no ombro, o abraço  
apertado ou mesmo o estar ali, quietinho, ao lado...*

*Sem nada dizer...*

*Alguém que ria de nossas piadas sem graça...*

*Que ache nossas tristezas as maiores do mundo...*

*E que apesar de todas essas mentiras úteis, nos seja de uma sinceridade  
inquestionável...”*

*William Shakespeare*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, por ter me guiado durante esta nova caminhada. Por estar sempre comigo, me dando força, calma, paciência e sabedoria para seguir em frente, superar os obstáculos e as dificuldades, me iluminando em direção a mais esta conquista.*

*Aos meus pais e meu irmão, pela força e paciência de sempre. Por terem suportado meu stress, pela ajuda financeira, pela palavra amiga nos momentos que mais precisei, por sempre terem acreditado em mim, por serem os que mais torceram por esta vitória.*

*Ao professor Dr. Jônatas Abrahão, por ter aceitado me orientar no meio do caminho e ter cumprido tão bem este papel. Obrigada por toda paciência e generosidade em me ensinar. Uma grande inspiração pra mim.*

*À querida professora Edel Stancioli, por ter aceitado ser minha orientadora no começo do projeto e por ter me guiado durante o início. Outra grande inspiração. Suas aulas de Virologia jamais serão esquecidas.*

*Ao professor Flávio da Fonseca por ter aceitado fazer parte da banca e por ter me possibilitado assistir aulas fantásticas de Biologia Molecular no início do ano.*

*À minha família querida, que sempre esteve comigo. Tias, tios, primos... Obrigada por me fortalecerem com suas orações e apoio.*

*Aos colegas de curso, pelo apoio em todos os momentos. Em especial à Priscila Jardim, que esteve sempre comigo.*

*Aos colegas de trabalho e ao meu chefe Pedro, por toda colaboração e compreensão em relação aos meus estudos. Obrigada pela torcida e incentivo!*

*Aos demais professores do curso de especialização, por se prestarem a nos ensinar de forma tão generosa.*

*À todos os funcionários da UFMG.*

*“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.”*

*Francis Bacon*

*"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade, é o a que devem tender os programas e os métodos de ensino."*

*Rui Barbosa*

## RESUMO

*A maioria dos vírus gigantes de DNA começaram a ser identificados a partir da década de 90. A presença de características peculiares e distintas daquelas vistas na maioria dos vírus até então conhecidos, despertaram grande interesse por parte da comunidade científica em relação a este grupo. Em 2003, um novo vírus gigante foi descoberto e impactou novamente os virologistas em todo o mundo, tamanha era sua complexidade estrutural e genética. Este foi nomeado mimivírus, devido a sua capacidade de mimetizar um microrganismo amebiano frente à coloração de Gram, que foi uma técnica utilizada como estratégia de identificação inicial da suposta bactéria, devido às dimensões tão extensas. Um ponto interessante é a associação de mimivírus com outro vírus menor, denominado Sputnik virus, que atua como um “virófago”, por ser capaz de parasitar os vírus da família Mimiviridae de uma forma especialmente invasiva. Além disso, estudos recentes comprovam que mimivírus é um potencial patógeno humano causador de pneumonia. É importante que os estudos acerca dos mimivírus continuem e intensifiquem-se, uma vez que podem gerar importantes questionamentos e até mesmo novas concepções quanto à natureza, diversidade e evolução dos vírus e até mesmo de outras formas de vida.*

*Palavras chave: Mimivírus. Vírus gigantes. Genoma. Pneumonia. Evolução.*

## ABSTRACT

*The most of giant DNA viruses began to be identified during the 90's. The presence of unique and distinct characteristics in this group of viruses, have raised a great interest of the scientific community. In 2003, a new giant virus was discovered and characterized, and impressed the virologists due its structural and genetic complexity: the mimivirus. Mimivirus, the largest virus known, was isolated from a free-living amoeba, and recent studies have showing that this virus is worldwide spread, present in water, soil and dust samples. Interestingly, mimivirus can be "infected" by another virus, named Sputnik virus. Sputnik is distinct of satellite virus, since is large, codify more than 20 proteins, and cause structural changes in mimivirus particles. In addition, recent studies show that mimivirus is a potential human pathogen, related with pneumonia. It is important the design and development of new studies on mimivirus, since it can raise interesting questions regarding viral evolution and diversity.*

*Key words: Mimivirus. Giant viruses. Genome. Pneumonia. Evolution.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 01</i> .....	11
<i>Figura 02</i> .....	13
<i>Figura 03</i> .....	13
<i>Figura 04</i> .....	14
<i>Figura 05</i> .....	16
<i>Figura 06</i> .....	17
<i>Figura 07</i> .....	19
<i>Figura 08</i> .....	22
<i>Figura 09</i> .....	23
<i>Figura 10</i> .....	24
<i>Figura 11</i> .....	28
<i>Figura 12</i> .....	29
<i>Figura 13</i> .....	30
<i>Figura 14</i> .....	35

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 01..</i> .....	<i>08</i>
--------------------------	-----------

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$  - Micrómetro

Å - Ångström

ACMV - *Acanthamoeba castellanii* mamavirus

APMV - *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus

AVL – Amebas de vida livre

bp – Pares de base

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAP B - DNA polimerase B

TFIIB - Fator de transcrição II B

FEN - Flap endonuclease

Kb - Quilobase

Mb - Megabase

MPAAs - Micro-organismos patogênicos associados a amebas

nm – Nanômetro

ORF – Fase aberta de leitura

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNAP II - RNA polimerase II

TGH – Transferência gênica horizontal

TopoIIA - Topoisomerase II A

UTI – Unidade de terapia intensiva

NCPLV - Vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	04
2.1 Objetivo geral .....	04
2.2 Objetivos específicos .....	04
3. RELEVÂNCIA .....	05
4. METODOLOGIA .....	06
5. DESENVOLVIMENTO .....	07
5.1 Vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV) .....	07
5.2 Amebas de vida livre .....	10
5.3 <i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i> e vírus relacionados .....	12
5.4 Estrutura geral dos mimivírus .....	15
5.5 Ciclo de multiplicação .....	18
5.6 Genoma .....	20
5.7 Virófagos .....	22
5.8 Evolução .....	25
5.9 Importância ecológica .....	31
5.10 Importância clínica .....	32
6. CONCLUSÃO .....	36
7. PERSPECTIVAS .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica sempre demonstrou grande interesse pelo estudo dos vírus, devido as características singulares presentes nos organismos deste grupo. Neste contexto, na última década, os vírus gigantes de DNA surgiram como uma fascinante linha de pesquisa para os virologistas em todo o mundo, principalmente por suscitarem importantes questionamentos sobre sua relação com seus hospedeiros e a evolução de outras formas de vida. A medida que novos estudos são publicados, novas dúvidas são reveladas, sugerindo que a pesquisa sobre os vírus gigantes é um campo em plena expansão. Embora, de uma maneira geral, os vírus gigantes de DNA apresentem importância ecológica e médica, os mimivírus merecem destaque especial, pois vêm sendo alvo de intensa pesquisa nos últimos anos, o que vêm gerando uma grande quantidade de informações relevantes.

Para Filée e Chandler (2010), “vírus gigantes” são aqueles com genomas superiores a 300 kb de comprimento, com mais de 300 genes anotados, cujas partículas apresentam mais de 200 nm de diâmetro, e que começaram a ser caracterizados à partir da década de 1990, como a maioria dos vírus pertencentes às famílias *Mimiviridae* e *Phycodnaviridae*. Todavia, muitos virologistas também consideram vírus gigantes de DNA os membros pertencentes às famílias *Poxviridae*, *Asfaviridae* e *Iridoviridae*. Entre os vírus gigantes identificados, existem grupos cujos os membros infectam uma grande variedade de eucariotos.

A descoberta dos mimivírus aconteceu a partir do estudo de micro-organismos presentes em um reservatório de água do sistema de refrigeração de um hospital em Bradford, na Inglaterra. Esta amostra de água foi coletada durante um surto de pneumonia ocorrido em 1992, e o estudo aprofundado deste material aconteceu no início dos anos 2000. O grupo de pesquisa francês coordenado pelo Dr. Didier Raoult (Universidade de Marseille, França) percebeu a presença de um micro-organismo crescendo em amebas e que se assemelhava a pequenos cocos Gram-positivos, isolados do material coletado em Bradford, em 1992. Após diversas tentativas mal-sucedidas de isolamento deste micro-organismo, os pesquisadores

decidiram fazer microscopia eletrônica do material, e surpreendentemente, foram visualizadas estruturas com simetria do tipo icosaédrica, muito semelhante a alguns vírus. Estudos genéticos posteriores revelaram que os “cocos de Bradford” eram, de fato, um novo vírus, então denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV). Foram identificadas características peculiares neste novo vírus, entre elas: presença de partículas maduras com diâmetro maior que 700 nm, não sendo, portanto, filtráveis através de malhas com poros de 0,2 µm, diferentemente da grande maioria dos vírus. As partículas de APMV não apresentam envelope externo, mas fibrilas de até 300 nm podem estar associadas ao capsídeo. Um ciclo de multiplicação típico de vírus, incluindo uma fase de eclipse, foi observado (LA SCOLA *et al.*, 2003).

APMV se multiplica em amebas, possui DNA de fita dupla, é visível ao microscópio óptico e recebeu este nome por parasitar a ameba *A. polyphaga* e por “mimetizar um micróbio” ao apresentar características de uma bactéria diante da coloração de Gram (DARE, CHITTAPANPITCH e ERDMAN, 2008; LA SCOLA *et al.*, 2008).

O genoma de APMV é maior do que o de várias bactérias, além de apresentar o maior número de genes anotados entre os vírus conhecidos, totalizando mais de 1000 fases abertas de leitura (ORFs) hipotéticas. Muitos destes genes, codificam proteínas não observadas anteriormente em outros vírus, como aminoacil-tRNA sintetases envolvidas no processo de tradução, chaperonas e enzimas envolvidas no reparo do DNA. Além disso, o conteúdo genético de APMV é o mais próximo de uma célula eucariota dentre os vírus descritos (MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007).

Denués e Raoult (2010) e La Scola *et al.* (2008) comentam que em 2008, a primeira amostra de APMV isolada perdeu o título de “maior vírus conhecido”, pois uma nova amostra de vírus gigante foi isolada em uma torre de resfriamento em Paris. Este vírus foi nomeado *A. castellanii mamavirus* (ACMV), ou simplesmente, mamavírus. O mamavírus possui morfologia muito semelhante a dos mimivírus, porém um genoma ligeiramente maior. Estudos filogenéticos confirmaram que o mamavírus pode ser considerado uma nova amostra da espécie APMV. Para estes autores, uma das características diferenciais dos vírus gigantes corresponde a sua

associação estreita com outros vírus menores denominados *Sputnik virus*. Este pequeno vírus é capaz de parasitar os vírus da família *Mimiviridae*, quando estes encontram-se multiplicando em uma ameba. Este processo de co-infecção leva a formação de vírions anormais e uma diminuição significativa na lise das amebas. Tal descoberta levou a criação do termo “virófago”, ou seja, vírus que infectam outros vírus.

Toda a complexidade biológica que envolve os vírus gigantes de DNA gera vários questionamentos. Muitos destes, ainda não foram completamente esclarecidos. Entretanto, várias hipóteses são sugeridas, das mais tradicionais as mais revolucionárias (CLAVERIE *et al.*, 2006).

Com base em estudos fenéticos e filogenéticos, Boyer e colaboradores propuseram uma hipótese na qual os vírus gigantes poderiam ser classificados como um novo grupo distinto dos três Domínios da vida conhecidos (*Bacteria*, *Archaea*, e *Eukarya*): os vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV). Embora novos estudos sejam necessários para a consolidação desta proposição, a proposta de criação do Domínio dos NCPLV trouxe importantes questionamentos para debate entre a comunidade científica, e pode revolucionar as concepções sobre diversidade e evolução da vida, que até então foi alicerçada no esquema tripartido dos três Domínios (BOYER *et al.*, 2010; MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008).

Conforme Claverie *et al.* (2006) e Ruiz-Saenz e Rodas (2010), as descobertas científicas atuais permitem novas discussões sobre a natureza e dinâmica biológica dos vírus, restabelecendo a polêmica sobre o que deve ser considerado "vivo" ou não. Em relação aos mimivírus, suas características singulares surpreendem, instigam e desafiam a comunidade de virologistas e evolucionistas. Para os autores, é preciso trabalhar este tema e tentar chegar a um consenso científico ou, pelo menos, reconhecer as surpresas frequentes da pesquisa microbiológica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve por objetivo a realização de uma pesquisa exploratória sobre os mimivírus, abordando tópicos tais como: histórico de descoberta, estrutura, genoma, importância ecológica e relevância médica, a fim de aprofundar o conhecimento sobre um assunto tão atual e promissor.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Aprofundar o conhecimento sobre os mimivírus e entender sua importância no contexto dos vírus gigantes de DNA;
- Buscar informações sobre o genoma dos vírus gigantes de DNA, incluindo questões como origem, organização e transferência gênica;
- Descrever os virófagos e a infecção do viroplasma dos mimivírus para destacar este interessante conceito de vírus que infectam vírus;
- Investigar a importância ecológica dos mimivírus;
- Demonstrar a importância clínica dos mimivírus na indução de pneumonias em humanos.

### **3. RELEVÂNCIA**

Foi importante a realização de uma pesquisa com este tema, visto ser um assunto recente. Os vírus gigantes correspondem a importantes modelos de estudo e possuem genes únicos que codificam funções metabólicas não vistas em outros vírus e assim, podem ajudar a entender a evolução de outras formas de vida. Há ainda, o surpreendente fato de serem infectados por outros vírus, o que reforça a tese de que os vírus poderiam ser considerados seres vivos, ainda que não apresentem organização celular.

#### 4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi elaborado em Belo Horizonte/MG, através de intensa revisão bibliográfica entre junho/2011 e novembro/2011, por meio de levantamento da literatura sobre o tema em questão, principalmente em artigos científicos. O material para pesquisa foi obtido na Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e por consulta em sites especializados na Internet: periódicos CAPES, *Scielo* e *Pubmed*. Os artigos obtidos para leitura foram em sua maioria na língua inglesa, publicados entre 1993 e 2011. Os termos utilizados na pesquisa, também em inglês, foram, por exemplo: *mimivirus*, *mamavirus*, *pneumonia*, *giant virus*, *genome*, *evolution*, entre outros.

## 5. DESENVOLVIMENTO

### 5.1 Vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV)

Os vírus são organismos parasitas intracelulares obrigatórios, tradicionalmente conhecidos e classificados como partículas ultramicroscópicas capazes de passar através de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ , e por apresentarem pequenos genomas codificadores de algumas poucas dezenas de proteínas. No entanto, um grupo muito especial de vírus, denominado genericamente de vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV), apresenta características típicas e exclusivas que diferem seus membros dos demais vírus conhecidos. Este grupo possui representantes com genomas de DNA dupla fita especialmente extensos, com capacidade de codificação de centenas de proteínas, o que confere relativa versatilidade metabólica aos membros. Os NCPLV, ou simplesmente vírus gigantes de DNA, estão sendo descobertos com uma frequência crescente, e o interesse da comunidade científica por estes organismos cresce de forma proporcional (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010).

Segundo Yutin *et al.* (2009), os NCPLV formam um grupo monofilético de vírus capazes de infectar eucariotos. Dentre as famílias de vírus incluídas neste grupo, tem-se: *Poxviridae*, *Phycodnaviridae*, *Iridoviridae*, *Asfarviridae* e a recém descoberta *Mimiviridae* (Tabela 01).

Apesar de formarem um grupo hipoteticamente monofilético, os vírus gigantes de DNA apresentam morfologia extremamente variada, inclusive, dentro de uma mesma família. Podem diferir ainda em relação ao estilo de vida e estrutura do genoma (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010).

Tabela 01 - Famílias pertencentes ao grupo dos vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV).

Família	Hospedeiros	Tamanho do genoma (kb)	Sítio de multiplicação
<i>Phycodnaviridae</i>	Algas	150-400	Núcleo e citoplasma
<i>Poxviridae</i>	Insetos, reptéis, aves, mamíferos	130-380	Citoplasma
<i>Asfarviridae</i>	Mamíferos	170	Citoplasma
<i>Ascoviridae</i>	Insetos	150-190	Núcleo e citoplasma
<i>Iridoviridae</i>	Insetos, vertebrados de sangue frio	100-220	Núcleo e citoplasma
<i>Mimiviridae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	1.180-1.280	Citoplasma

**Fonte:** Adaptado de Yutin *et al.* (2009).

Os vírus do grupo NCPLV são capazes de infectar animais, plantas e eucariotos unicelulares. Eles demonstram relativa independência diante do sistema de transcrição de seus hospedeiros para realizar seu ciclo de multiplicação, pois são capazes de sintetizar, autonomamente, várias proteínas necessárias ao processo, como DNA polimerases, helicases, topoisomerases e chaperonas. Tais genes são compartilhados pela maioria dos NCPLV, e sustentam as análises filogenéticas que atribuem o caráter monofilético ao grupo (RAOULT, 2005; KOONIN e YUTIN, 2010; YUTIN *et al.*, 2009).

O mínimo de genes compartilhados necessários para que se considere que um grupo de organismos derivou de um ancestral comum é de 47 genes conservados, justamente o que ocorre entre os NCPLV. Existem especialistas que acreditam que os NCPLV evoluíram e se diversificaram ao perder alguns dos genes comuns e adquirir novos genes de seus hospedeiros. Outros pesquisadores sugerem que a evolução do grupo se deu a partir de um vírus ancestral ainda maior e com o genoma mais extenso, que gradativamente foi se adaptando e especiando via redução genômica. Há ainda outra teoria de que os NCPLV derivaram de um

ancestral com genoma pequeno, que se diversificou por simples aquisição de genes dos hospedeiros (ETTEN, LANE E DUNIGAN, 2010).

A limitação técnica foi um dos motivos para que os vírus gigantes de DNA não tenham sido detectados há mais tempo, pois procedimentos de isolamento viral clássicos, como a filtração em malha de 0,2  $\mu\text{m}$ , causava a retenção da maioria dos NCPLV. Além disso, a seleção dos sistemas celulares representava um problema, uma vez que alguns vírus gigantes de DNA apresentam espectro de hospedeiros muito restrito, como os mimivírus, que até o momento só puderam ser isolados e multiplicados em amebas. Sendo assim, a maioria dos vírus gigantes de DNA ambientais foram inicialmente detectados com o auxílio de dados metagenômicos (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010).

A possibilidade de analisar sequências genéticas obtidas por metagenômica permite a investigação da biodiversidade microbiana nos mais diversos ambientes. Em relação aos vírus gigantes, a comparação entre sequências depositadas em bancos de dados e sequências obtidas de amostragens ambientais deve ser cautelosa, uma vez que devido ao tamanho e complexidade genômica, estes podem acabar sendo confundidos com bactérias. Embora o isolamento e caracterização dos mimivírus tenha sido realizada a partir dos cocos de Bradford, conforme descrito anteriormente, sequências gênicas de mimivírus obtidas por metagenômica de águas oceânicas já haviam sido depositadas no GenBank há alguns anos. Após a correta identificação de APMV como vírus, pesquisadores iniciaram uma busca intensa por “parentes” semelhantes. As análises realizadas com amostras do mar de Sargasso, por exemplo, mostraram que a maioria das sequências mais próximas de mimivírus, estavam presentes entre um *pool* "bacteriano", porém, com posteriores análises filogenéticas mais detalhadas foi demonstrado que tais sequências seriam estritamente relacionadas a vírus gigantes ainda desconhecidos, porém, abundantes no ambiente marinho. Muitos outros vírus interessantes e incomuns podem estar espalhados pelos mais diversos ambientes. Sendo assim, a descoberta e caracterização dos NCPLV está em sua fase inicial e poderá representar um grande desafio para os virologistas, sobretudo devido à intensa troca horizontal de genes realizada por eles. (CLAVERIE *et al.* 2006; ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; GHEDIN e CLAVERIE, 2005).

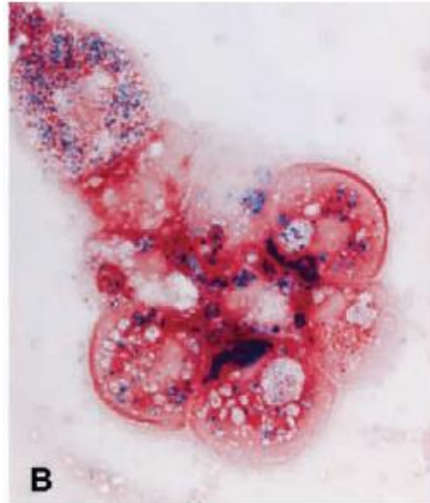
## 5.2 Amebas de vida livre

As amebas do gênero *Acanthamoeba*, pertencem a um grupo de protozoários intitulado amebas de vida livre (AVL). Estas são extremamente ubíquas, e já foram isoladas em ambientes aquáticos, solo, ar, sistemas de tratamento de esgoto, ambientes hospitalares, sistema de ventilação e ar condicionado e em lentes de contato. Podem ser encontradas como parte da microbiota normal de alguns animais, incluindo o homem. As AVL são extremamente resistentes a extremos de pH e temperatura, e são altamente estáveis após tratamento com desinfetantes (CROZETTA, 2007; DUARTE, 2010; SILVA e ROSA, 2003).

Até o momento, já foram descritas aproximadamente vinte e quatro espécies para o gênero *Acanthamoeba*, sendo as mais estudadas: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* e *A. divionensi*, geralmente associadas a doenças em indivíduos imunodebilitados. Estas espécies são caracterizadas por apresentarem duas fases em seu ciclo de vida: trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz e oocística, que se desenvolve em situações de condições desfavoráveis de sobrevivência. As AVL podem causar doenças graves e crônicas, entre as quais, tem-se: encefalite amebiana granulomatosa, acantamebíase cutânea, ceratite amebiana e a meningoencefalite amebiana primária (CROZETTA, 2007).

Os micro-organismos patogênicos associados a amebas (MPAAs) (Fig. 01) representam agentes causadores de pneumonia, que ganharam destaque nos últimos anos (GREUB e RAOULT, 2004). Fazem parte dos MPAAs micro-organismos dos gêneros *Legionella*, *Parachlamydia*, *Mycobacterium*, dentre outros (GREUB e RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Embora ainda seja debatido o quão importante são estes patógenos em termos de números absolutos de casos de pneumonia, uma parte da comunidade científica acredita que os MPAAs estão associados a muitos casos nosocomiais de infecção pulmonar (*revisado* por GREUB e RAOULT, 2004).

Figura 01 - Crescimento de MPAA'S do gênero *Parachlamydia* em amebas, observado através de microscopia óptica após a coloração de Gram.



Fonte: Raoult, La Scola e Birtles, 2007.

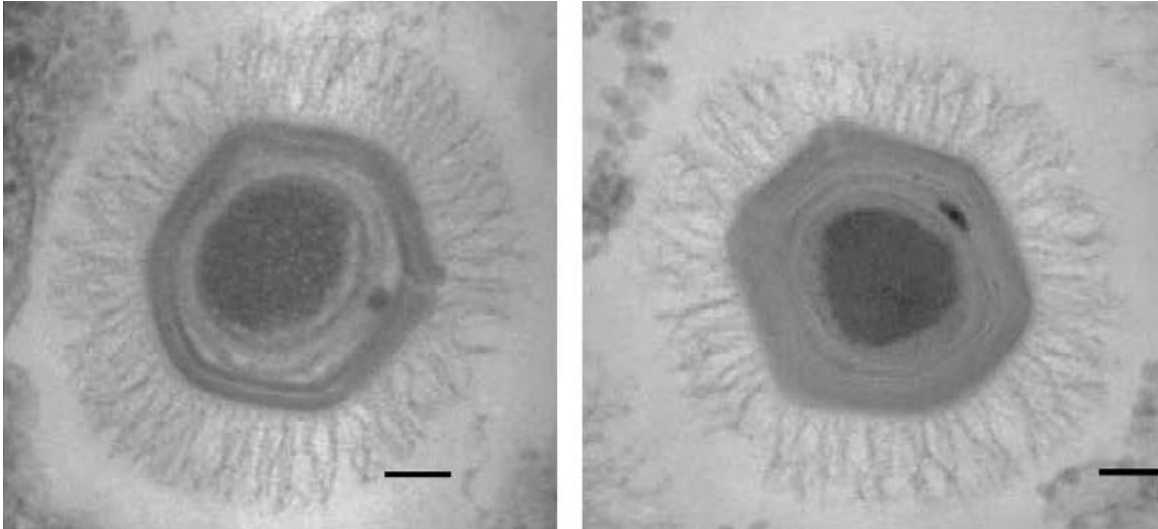
Análises realizadas por diversos grupos de pesquisa demonstram que os MPAA's são patógenos que mesmo após serem fagocitados por amebas, resistem ao ambiente intracelular, e muitas vezes conseguem se multiplicar e produzir progênie numerosa (FRITSCHÉ *et al.*, 1993; GREUB E RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Desta forma, é possível que diferentes gêneros de AVL, como *Acanthamoeba* sp., funcionem como plataformas biológicas de amplificação e propagação de MPAA's (FRITSCHÉ *et al.*, 1993; GREUB e RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Este dado ganha importância quando são considerados diversos estudos realizados em pequenas, médias e grandes instituições de saúde, que revelaram a presença de AVL em objetos e no piso de diversos ambientes hospitalares, como unidades de terapia intensiva (UTI), centro cirúrgico, berçário, cozinha, emergência e setor de doenças infecciosas (CARLESSO *et al.*, 2007; SILVA e ROSA, 2003).

Todavia, apesar de toda atenção e importância que vem sendo atribuída às AVL e aos MPAA's nos últimos anos, uma descoberta recente chamou atenção da comunidade científica e agregou ainda mais valor aos MPAA's: o isolamento e caracterização dos mimivírus (LA SCOLA *et al.*, 2003).

### 5.3 *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* e vírus relacionados

Os mimivírus (Fig. 02) foram descobertos após anos de estudos relacionados com a caracterização de MPAAAs associados a pneumonias nosocomiais, realizados por um grupo de pesquisadores franceses, coordenado pelo Dr. Didier Raoult. A descoberta foi iniciada após a identificação de um MPAA muito especial, presente em uma ameba da espécie *A. polyphaga* (Fig. 03). Embora este MPAA apresentasse dimensões bacterianas e características de um Gram-positivo, não respondia a nenhuma classe de antibióticos. Após diversas estratégias de estudo, o grupo resolveu então realizar microscopia eletrônica deste MPAA diferenciado, que revelou, de forma surpreendente, a estrutura de um grande vírus com simetria do tipo icosaédrica. Este vírus, que segundo os pesquisadores, “mimetizava um micróbio” amebiano, foi denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV). A caracterização do APMV revelou números e características surpreendentes, que de certa forma, revolucionaram a percepção e conceitos dos virologistas e outros microbiologistas. Os mimivírus são atualmente os vírus que apresentam as maiores dimensões conhecidas (até 800 nm), maiores até mesmo que algumas bactérias (ex. *Mycoplasma*), e por isso são visualizáveis por microscopia óptica (LA SCOLA *et al.*, 2003).

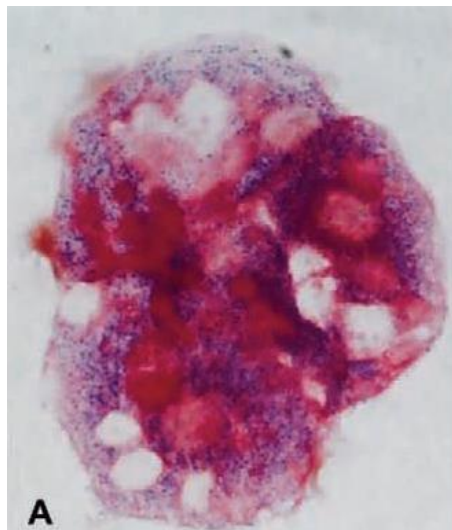
Figura 02 - Mimivírus visualizado através de microscopia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas.



Nesta micrografia é possível observar o capsídeo protéico e a membrana interna, que envolve o genoma viral. Externamente é possível visualizar as nano-fibras associadas ao capsídeo.

**Fonte:** Claverie *et al.*, 2009.

Figura 03 - Mimivírus corados de violeta após coloração de Gram, visualizados dentro de amebas sob microscopia óptica.

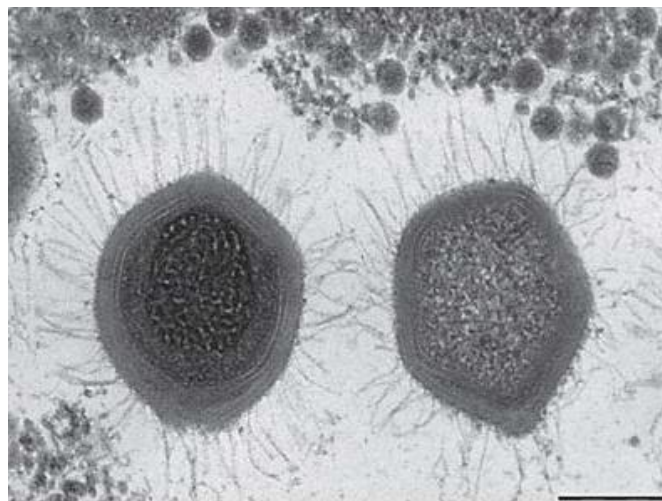


**Fonte:** Raoult, La Scola e Birtles, 2007.

De acordo com Raoult, La Scola e Birtles (2007) e Klose *et al.* (2010), inicialmente o vírus foi erroneamente identificado como uma bactéria Gram-positiva

porque sua superfície protéica e as suas nanofibras apresentam afinidade química pelo corante cristal violeta. Além disso, a ausência de envelopes lipídicos externos torna o vírus resistente ao tratamento com éter-acetona durante o processo de coloração de Gram. Na ocasião da descoberta, por apresentar características diferenciais que não permitiam sua classificação em uma família viral já existente, a família *Mimiviridae* foi criada para incluir APMV, que foi, por cinco anos, o único membro desta família. Porém, em 2008, uma nova amostra viral foi isolada de uma torre de resfriamento em Paris, sendo este nomeado mamavírus (Fig. 04), por ter o genoma ligeiramente maior (DESNUES e RAOULT, 2010).

Figura 04 - Imagem de partículas de mamavírus obtida por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Desnues e Raoult, 2010.

O mamavírus foi isolado originalmente de *A. polyphaga*, porém todos os trabalhos posteriores foram realizados em *A. castellanii*, sendo o vírus então batizado de *A. castellanii mamavirus* (ACMV). Este vírus possui morfologia e propriedades muito semelhantes as do mimivírus. Assim como o APMV, o ACMV possui genes codificadores de proteínas envolvidas na transcrição e tradução gênica (COLSON *et al.*, 2011).

A prospecção de outros vírus gigantes de DNA continua. O *Marseillevirus*, por exemplo, também foi isolado de AVL. Este vírus, entretanto, apresenta características genéticas um pouco distantes de APMV e ACMV (RAOULT e BOYER, 2010).

Marseillevírus apresenta um genoma de 368 kb, possui simetria do tipo icosaédrica, com diâmetro de cerca de 250 nm. A partícula viral apresenta tanto proteínas que desempenham funções estruturais, quanto fatores envolvidos na fase inicial do ciclo de multiplicação do vírus. É composto de genes de várias fontes distintas, obtidos a partir de hospedeiros eucarióticos e de outros MPAAAs. Embora o marseillevírus compartilhe diversos genes conservados com os membros da família *Mimiviridae*, estudos genéticos indicam que estes vírus provavelmente devem ser agrupados em uma família distinta (BOYER *et al.*, 2009).

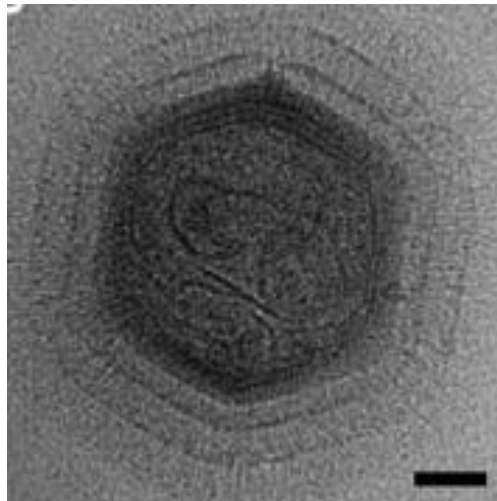
#### **5.4 Estrutura geral dos mimivírus**

Segundo Claverie e Abergel (2010) uma das principais maneiras de diferenciar um vírus de outros micro-organismos consiste na avaliação de sua capacidade de atravessar um filtro com poros de tamanho específico, sobretudo os de 0,2 µm. Por ser um “vírus completamente não filtrável”, mimivírus quebrou este dogma antigo.

O capsídeo externo dos mimivírus apresenta 450 nm de diâmetro, o que já o colocaria no topo da lista dos maiores vírus já descritos. Todavia, além do capsídeo gigante, a partícula viral apresenta em toda a sua superfície nano-fibras protéicas, aumentando consideravelmente as dimensões deste vírus, que pode alcançar até 800 nm. A função destas fibras ainda não foi totalmente elucidada, mas alguns autores acreditam que elas podem ser importantes no processo de agregação viral e para proteção do vírus contra radiação solar. Ensaios utilizando lisozima sugerem que as fibras podem ser imersas em uma matriz de peptidoglicano, o que seria condizente com a coloração de Gram. Por microscopia eletrônica é possível

observar dois halos de fibras (Fig. 05) em volta da partícula, cada um com uma densidade distinta (XIAO *et al.*, 2009).

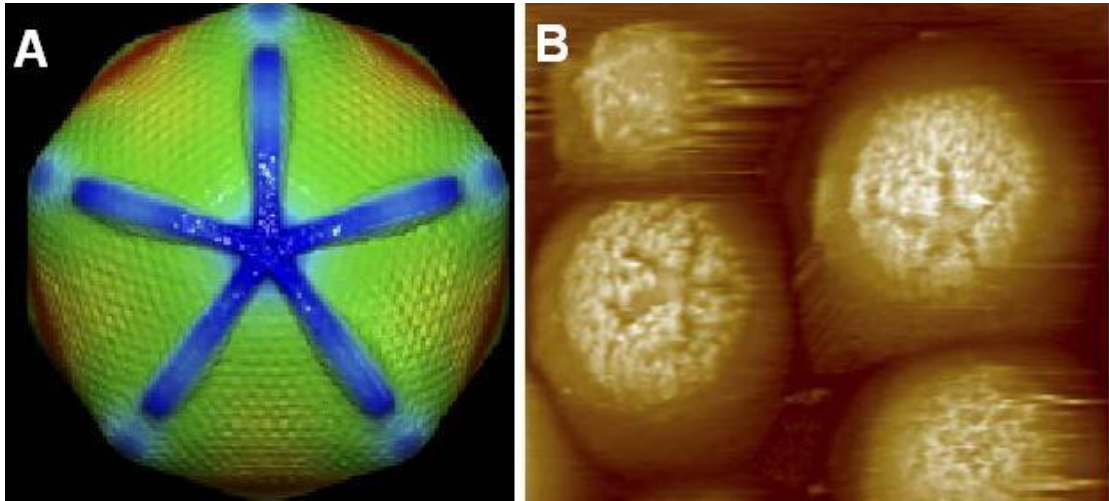
Figura 05 - Imagem de halos de nano-fibras protéicas que circundam o capsídeo de mimivírus obtida por crio-microscopia eletrônica.



Fonte: Xiao *et al.*, 2009.

Embora estudos preliminares tenham sugerido que os mimivírus apresentam capsídeo com simetria genuinamente icosaédrica, Xiao e colaboradores (2009) demonstraram que isto pode não ser verdade. Projeções computacionais baseadas em imagens obtidas da partícula viral por microscopia eletrônica e de força atômica revelaram que os mimivírus apresentam simetria pentagonal, do tipo icosaédrica, mas não icosaédrica-típica. Nesta simetria, um dos eixos é formado pela junção de faces compostas por capsômeros, que convergem para uma depressão central. Denominada de forma “*star-fish*” ou “*star-gate*” (Fig. 06), esta simetria permite que o genoma viral seja liberado por esta região do vírus, podendo ser importante durante os momentos iniciais do ciclo de multiplicação viral. Esta estratégia de liberação do genoma dos mimivírus é muito semelhante à de alguns bacteriófagos, e provavelmente representa um exemplo de convergência adaptativa. O número de triangulação estimado para os mimivírus é de 1200 (XIAO *et al.*, 2009).

Figura 06 - *Star-fish* ou *star-gate*.



Esta estrutura é formada em um dos eixos do capsídeo pela junção de faces compostas por capsômeros, que convergem para uma depressão central, a qual permite a liberação do genoma viral. A: imagem obtida através projeção computacional baseada em crio-microscopia eletrônica; B: imagem obtida através de microscopia de força atômica.

**Fonte:** Xiao *et al.*, 2009.

Estudos sobre a estrutura interna das partículas dos mimivírus revelaram a presença de uma membrana interna envolvendo o genoma. Esta membrana apresenta uma concavidade direcionada para a face “*star-fish*” do capsídeo externo, o que parece estar relacionado com o processo de liberação do genoma. No restante da partícula, a membrana interna e o capsídeo externo estão separados por um vão de aproximadamente 400 Å. O genoma dos mimivírus parece estar imerso em uma matriz fibrosa (XIAO *et al.*, 2009).

Xiao *et al.* (2009) discutem que a estrutura dos mimivírus pode ser um reflexo da sua grande capacidade de adquirir genes de forma horizontal. A associação do genoma com uma matriz fibrosa se assemelha à estrutura dos grandes genomas eucariotos; a liberação do genoma por mecanismo de “*star-gate*” é observado em fagos; e por fim, a matriz de peptidoglicano que envolve as nano-fibras externas pode ter sido derivada de bactérias. Embora meramente especulativas tais proposições suscitaram debates.

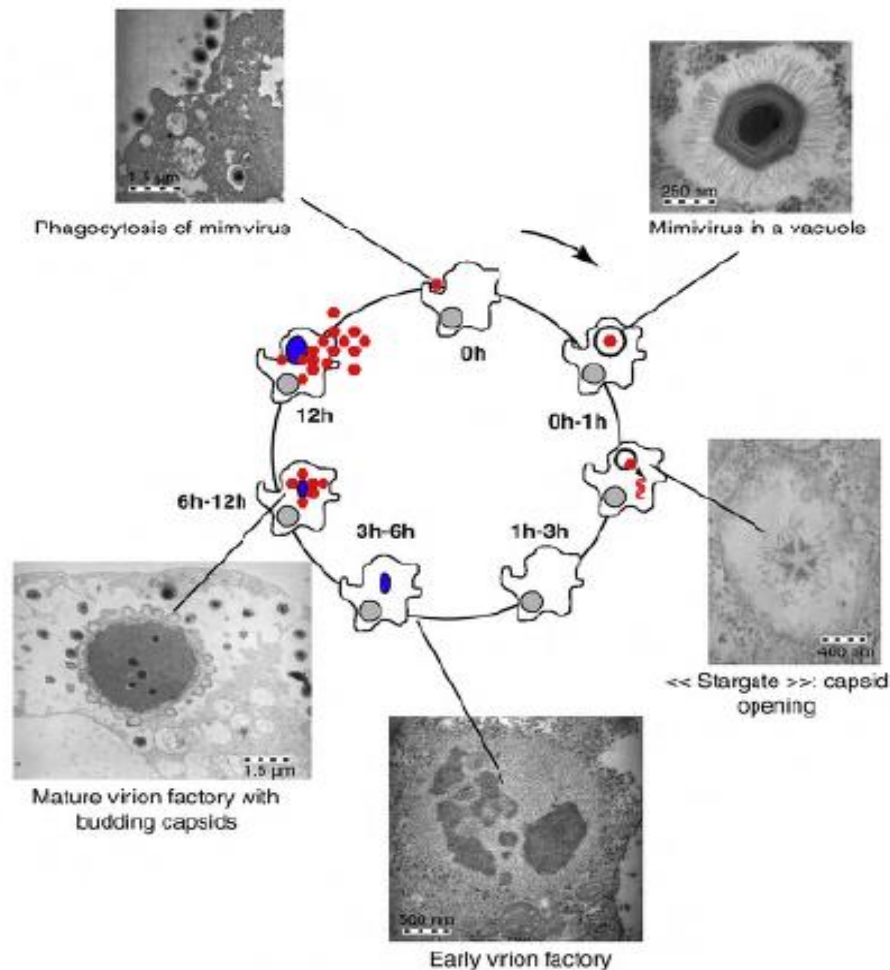
## 5.5 Ciclo de multiplicação

Mutsafi *et al.* (2010) e Suzan-Monti *et al.* (2007) demonstraram através de seus estudos que os mimivírus possuem um ciclo de multiplicação peculiar, assim como o poxvírus, em relação aos outros componentes do grupo NCPLV. Os dois compartilham a replicação caracterizada por ocorrer exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira. Porém, este não deve ser considerado um processo independente do núcleo hospedeiro, uma vez que fatores nucleares necessários a replicação podem participar do processo. Entre os diferentes MPAA's conhecidos até o momento, mimivírus parece ser o único a possuir um efeito tão rápido e lítico sobre as amebas e um centro de replicação que garante grande autonomia sobre o maquinário celular do hospedeiro.

Após a infecção de mimivírus em amebas através de um processo fagocitário, partículas virais são mantidas em fagossomos. A fusão da membrana viral com a membrana do vacúolo da ameba e a ação de lisossomos sobre o sistema formam uma abertura única e centralizada no capsídeo viral, na estrutura *star-fish*, através da qual ocorre a passagem do genoma viral para o citoplasma da célula hospedeira. Como os mimivírus possuem proteínas capazes de processar o ácido nucléico, o genoma é desnudado e se estabiliza sob a forma de núcleos esféricos livres, ao redor dos quais se formam as chamadas fábricas virais, que inicialmente foram erroneamente identificadas como o núcleo do hospedeiro, devido ao seu tamanho e aspecto. Nestas fábricas ocorrem os estágios inicial e tardio de replicação e transcrição (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; MUTSAFI *et al.* 2010; SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2009).

O ciclo de multiplicação dos mimivírus (Fig. 07) em seu início é marcado por uma fase de eclipse típica, de cerca de 2 horas, na qual partículas virais não são visualizadas na célula (CLAVERIE e ABERGEL, 2009; LA SCOLA *et al.*, 2008; LEGENDRE *et al.*, 2010).

Figura 07 - Ciclo de multiplicação de mimivírus em *A. polyphaga*.



Esquematização baseada em imagens obtidas por microscopia eletrônica. Mimivírus é representado por pontos vermelhos, a fábrica viral por um círculo azul, o núcleo da célula por um círculo cinza e o vacúolo por um círculo branco.

**Fonte:** Claverie e Abergel, 2010.

A transcrição inicial dos genes de mimivírus parece ser correlacionada com a presença de uma sequência promotora altamente conservada: AAAATTGA. A fase tardia de replicação ocorre em média seis horas após o início da infecção, quando passa a ocorrer a montagem dos vírions e empacotamento de DNA, tornando-se visíveis na periferia das grandes fábricas citoplasmáticas. Foi observado que os mRNAs sintetizados se acumulam no citoplasma, em sítios vizinhos às fábricas, porém, distintos daqueles nos quais ocorrem a replicação. (CLAVÉRIE *et al.*, 2009; CLAVÉRIE e ABERGEL, 2009; MUTSAFI *et al.*, 2010).

Na fase tardia ocorre um aumento da fábrica viral, sendo possível distinguí-la do núcleo hospedeiro claramente. Este aumento é caracterizado pela fusão de pequenas fábricas entre si e por um aumento na produção de DNA viral. Nesta fase, também é possível observar uma alta acumulação de vírions em fase final de morfogênese, precedendo sua liberação no citoplasma da célula (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007).

A coloração fluorescente do DNA de mimivírus utilizada nos experimentos de Suzan-Monti *et al.* (2007) possibilitou a descoberta de que os capsídeos pré-formados já estão preenchidos com o DNA viral. Como capsídeos virais foram observados na periferia das fábricas virais, pode ser pertinente concluir que as proteínas virais presentes nas partículas são quase totalmente sintetizadas nestes sítios. Além disso, a análise de dados proteômicos mostrou que não há proteínas celulares do hospedeiro incorporadas dentro das partículas virais, o que sugere um mecanismo ativo de exclusão de proteínas celulares (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007).

## 5.6 Genoma

O genoma dos mimivírus é composto por uma molécula de DNA de dupla fita, variando de 1,2 Mb (APMV) a 1,3 Mb (megavírus), codificando aproximadamente 1000 proteínas. Este tamanho relativamente grande do genoma permite aos mimivírus codificarem proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que aumentam seu valor adaptativo (CLAVERIE e ABERGEL, 2010).

Para Suhre (2005) o genoma dos mimivírus detém duas vezes mais informação genética do que pequenas bactérias necessitam durante todo seu ciclo de vida e uma grande fração deste conteúdo genético exhibe pouca ou nenhuma homologia com quaisquer outros genes conhecidos nas atuais bases de dados. Apenas 9% do genoma é não codificador.

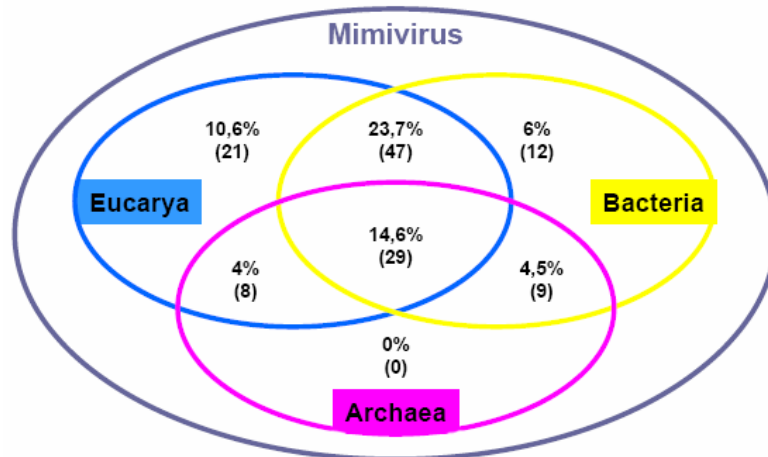
A região central do genoma dos mimivírus é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Estudos comparativos revelaram que pouca variação é observada entre os

genomas de APMV e ACMV, todavia estas variações se concentram nas extremidades do genoma. ACMV apresenta na extremidade 5' de seu genoma cerca de 1.3000 bp de sequências duplicadas, provavelmente adquiridos por transferência gênica lateral de um organismo desconhecido (COLSON *et al.*, 2011b).

Das mais de 1000 ORFs presentes nos mimivírus, muitas são codificadoras de proteínas nunca antes observadas em outros vírus. Dentre estas, merecem destaque proteínas envolvidas na tradução protéica, no reparo do DNA, em motilidade celular, biogênese de membranas, chaperonas, dentre outras. Além disso, os mimivírus compartilham alguns genes com outros NCPLV, envolvidos no metabolismo de nucleotídeos e de DNA. Estas características únicas reacendem discussões conceituais sobre a natureza dos vírus e sobre a fronteira entre os vírus e organismos celulares (LEGENDRE *et al.*, 2011).

A transferência gênica horizontal (TGH) (Fig. 08) também contribui para a relativa expressividade numérica de genes observada nos mimivírus. Pelo menos 126 genes presentes na família *Mimiviridae* parecem ter sido adquiridos por TGH. Mais de 88 genes de mimivírus apresentam homólogos em *Bacteria*. Ao todo, mimivírus apresenta 46 genes homólogos de *Archaea* e mais de 80 homólogos de *Eukarya* (COLSON *et al.*, 2011a).

Figura 08 - Distribuição taxonômica de ORFs conservadas em mimivírus. O número de homólogos nos três domínios da vida é mostrado.

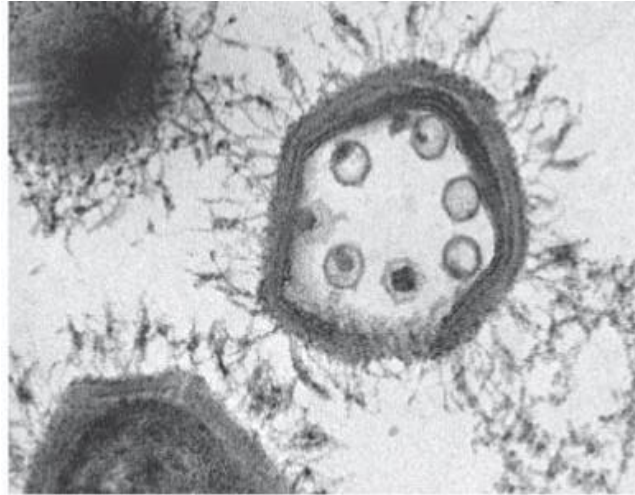


Fonte: Moreira e Brochier-Armanet, 2008.

## 5.7 Virófagos

De acordo com Desnues e Raoult (2010), uma das características mais interessantes dos mimivírus está relacionada à sua susceptibilidade a um outro vírus, conhecido como *Sputnik virus* (Fig. 09). Sputnik é um vírus de simetria icosaédrica, com aproximadamente 50 nm de diâmetro e um genoma de 18 kb, que contém um mosaico de genes relacionados com bacteriófagos, vírus e amebas.

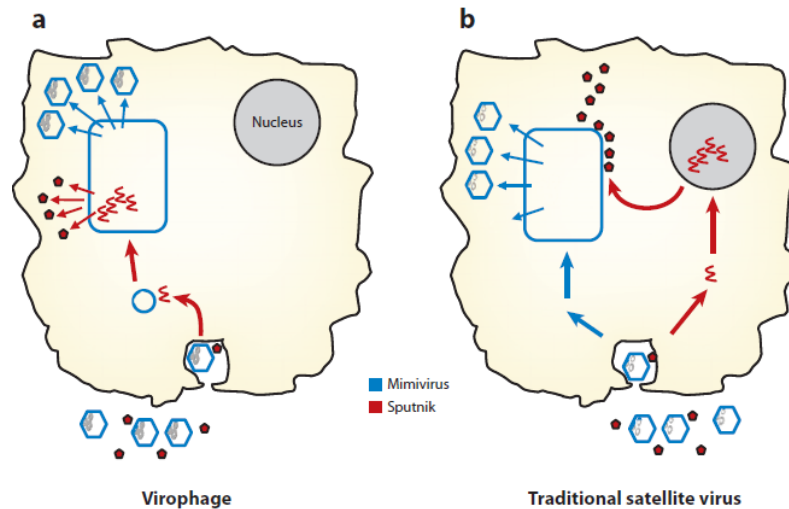
Figura 09 - *Sputnik virus* observado dentro de capsídeos de mamavírus.



Fonte: La Scola *et al.* 2008.

*Sputnik* possui genoma de DNA fita dupla, circular, altamente rico em AT, hipoteticamente capaz de codificar 21 proteínas, que variam de 88 a 779 aminoácidos em sua composição. Dessas 21 proteínas, 13 não possuem homólogos detectáveis em atuais bancos de dados de sequências nucleotídicas. Os outros 8 genes têm homólogos em vírus capazes de infectar hospedeiros pertencentes aos três domínios da vida (SUN *et al.*, 2010).

O *Sputnik virus* foi identificado primeiramente como um vírus defeutivo, ou seja, um vírus que depende do processo de co-infecção de uma célula hospedeira com um vírus auxiliar para sua multiplicação. No entanto, assim como mimivírus, o sputnik apresenta uma complexidade genômica e estrutural fora dos padrões dos vírus defeitivos até então conhecidos. A multiplicação do vírus sputnik nas fábricas dos mimivírus, assemelha-se a de vírus satélites que acometem animais e plantas, como o vírus da hepatite D e o vírus da necrose do tabaco, respectivamente. No entanto, a reprodução do sputnik parece prejudicar a morfogênese e a produção de vírions normais dos mimivírus indicando que ele é um parasita genuíno (Fig. 10). Do ponto de vista biológico, a infecção por sputnik resulta em uma redução de 70% do efeito citopático do vírus gigante sobre a ameba e leva a formação de algumas formas virais atípicas, de um modo nunca descrito para os vírus defeitivos tradicionais (DESNUES e RAOULT. 2010; LA SCOLA *et al.*, 2008).

Figura 10 - Virófago *versus* vírus satélite.

a: regime de multiplicação correspondente ao conceito virófago: nele, a multiplicação do sputnik ocorre inteiramente em fábricas dos mimivírus e não depende do núcleo da célula hospedeira. b: o regime de multiplicação de um vírus satélite tradicional: após entrar para o citoplasma do hospedeiro, os dois vírus seguem cursos distintos. Embora os mimivírus gerem fábricas nas quais sua replicação ocorre, o sputnik se aproveita do núcleo da célula hospedeira para a replicação de seu genoma. Apenas na fase de montagem de partículas, sputnik necessitaria da ajuda de mimivírus.

**Fonte:** Claverie e Abergel, 2009.

O sputnik não se multiplica quando diretamente inoculado em *Acanthamoeba*. No entanto, este vírus cresce como demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão e PCR em *Acanthamoeba* já infectadas com mimivírus ou mamavírus. Tal dependência metabólica poderia ser um simples reflexo do modelo de estudo. Desta forma, a existência de um possível hospedeiro eucarioto ou procaríoto para o sputnik não pode ser completamente rejeitada (LA SCOLA *et al.*, 2008).

De acordo com La Scola *et al.* (2008), o genoma de sputnik contém genes evolutivamente relacionados com fontes distintas, incluindo os vírus da família *Mimiviridae*, provavelmente adquiridos após a associação com APMV ser estabelecida. Dentro das fábricas virais, a replicação concomitante dos genomas de mimivírus e sputnik pode resultar em troca genética.

Estudos relacionados aos virófagos vêm sendo desenvolvidos paralelamente à caracterização biológica dos mimivírus. Foi demonstrado que o sputnik não se

multiplica durante uma co-infecção com o marselevírus. Todavia, a multiplicação deste NCPLV é atrasada. O porquê isso acontece não foi totalmente elucidado, mas pode ser que nas fases iniciais do ciclo de multiplicação do vírus, por exemplo, ocorra a produção de inibidores. Outros agentes similares ao sputnik devem ser descobertos nos próximos anos e o termo virófago poderia ser usado como um nome genérico para designá-los (DESNUES e RAOULT, 2010; LA SCOLA *et al.*, 2008).

## 5.8 Evolução

Para Moreira e Brochier-Armanet (2008), desde a sua descoberta, os vírus são considerados um verdadeiro quebra-cabeça, especialmente para aqueles que estudam evolução. Devido à sua natureza como entidades na fronteira entre os vivos e os não-vivos, o debate sobre sua origem tem sido constante e recentemente ganhou um impulso sem precedentes, com a descrição dos genomas dos mimivírus.

Há mais de duas décadas, Carl Woese propôs a divisão dos seres vivos em três Domínios: *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*. *Bacteria* são os organismos estruturalmente mais simples que não possuem um núcleo para manter seu material genético. *Archaea*, embora morfológicamente semelhante à *Bacteria*, apresenta uma diferenciada composição fosfolipídica de membrana, e compartilha semelhanças com *Eukarya*. Finalmente, *Eukarya* contém um núcleo verdadeiro no interior das células, onde o material genético é protegido. Sempre foi considerado que os genomas da maioria dos vírus não contêm informações suficientes que suportem a classificação dos mesmos em um Domínio próprio. Porém, com a descoberta de mimivírus, este argumento foi enfraquecido. Surpreendentemente, os mimivírus apresentam genes que são comuns aos três domínios mencionados. Para alguns pesquisadores, este fenômeno coloca APMV na mesma definição de vida que é atribuída a esses Domínios, ou pelo menos APMV mereceria sua própria definição de vida (RUIZ-SAENZ e RODAS, 2010; WILLIAMS, EMBLEY e HEINZ, 2011).

O tamanho do genoma do mimivírus e o conteúdo genético, bem como a presença de genes previamente reconhecidos como específicos para os organismos celulares (como aminoacil-tRNA sintetases), reavivou o debate sobre a origem evolutiva dos vírus de DNA e seu papel no suposto surgimento do núcleo eucariótico ou no advento de genomas de DNA (JEUDY *et al.*, 2009).

Vários estudos filogenéticos, que analisam a identidade de genes isolados, têm sido realizados com a finalidade de obter-se mais conhecimento sobre a natureza de todas as formas de vida, através da identificação de genes codificadores de proteínas em comum (BOYER *et al.*, 2010).

As enzimas do grupo timidina sintetase, por exemplo, estão envolvidas na biossíntese de oligonucleotídeos de DNA em células eucarióticas e tiveram seus genes identificados também em NCPLV. A principal timidina sintetase presente em NCPLV é a do tipo A. Reconstruções filogenéticas evidenciaram dois agrupamentos, um que inclui bactérias, bacteriófagos e *Archaea*, e outro, que inclui eucariotos e seus vírus. Proteínas envolvidas na replicação e reparo do DNA, como DNA polimerase B (DNAP B) e Topoisomerase II A (TopoIIA) são amplamente distribuídas em NCPLV e suas árvores filogenéticas foram construídas a partir do alinhamento de sequências protéicas de arqueas, bactérias, vírus e eucariotos. Já a Flap endonuclease (FEN) não foi encontrada em *Bacteria*, mas sua árvore filogenética corrobora com a divisão em Domínios *Archaea*, *Eukarya* e NCPLV monofiléticos. A reconstrução filogenética de proteínas envolvidas na transcrição, como a RNA polimerase DNA dependente (RNAP II), revela um clado contendo NCPLV claramente distintos de *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*. Já a árvore filogenética do Fator de transcrição II B (TFIIB), revelou que este é ausente em *Bacteria*, e sugere que genes codificantes de proteínas envolvidas na biossíntese de RNA em NCPLV são altamente conservados e surgiram em um clado tão antigo quanto os de *Eukarya* e *Archaea*. As amino-acil tRNA sintetase são proteínas envolvidas no processo de tradução. O estudo filogenético de seus genes demonstrou que dentro deste grupo há genes que são encontrados nos táxons *Mimiviridae*, *Eukarya* e *Amoebazoa*. Este fato levantou a hipótese de que tais genes podem ter sido transferidos a partir de um ancestral viral para amebas, o que é sustentado pela demonstração de que os genes correspondentes a estas proteínas são comumente

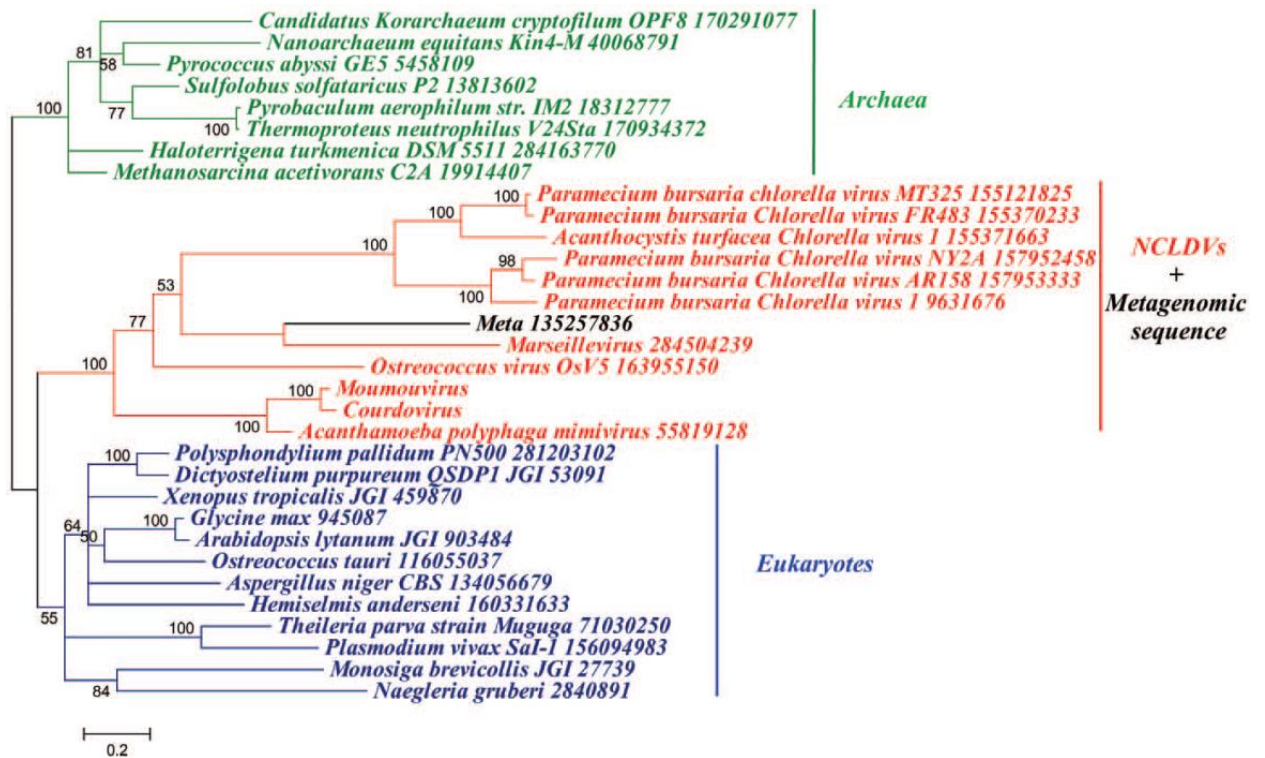
trocados. Sendo assim, os vírus também estão incluídos no confuso cenário evolutivo destas proteínas. Por fim, o fator de alongação EF gerou uma árvore filogenética através da qual foi possível analisar o compartilhamento de genes entre *Archaea*, *Eukarya* e família *Mimiviridae* (BOYER *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos com as análises dos genes correspondentes a RNAP II, TFIIB, FEN e fator de proliferação celular em árvores filogenéticas sugeriram ainda que os NCLPV emergem do clado que liga *Archaea* a *Eukarya* como um grupo monofilético (BOYER *et al.*, 2010).

Estudos fenéticos, que analisam a presença ou ausência de um gene entre vários organismos, também são realizados com o intuito de esclarecer a origem dos genes de mimivírus. Nos resultados obtidos por Boyer *et al.* (2010), foi verificada uma árvore na qual era evidente a existência de um clado distinto para NCPLV, *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*. Dessa forma, o estudo fenético mostrou-se coerente com o estudo filogenético, pois os dois mostraram quatro Domínios distintos. Este fato levou ao questionamento da veracidade das árvores baseadas em análise de RNA ribossomal, uma vez que estas excluem os vírus, e de acordo com os estudos destes pesquisadores, não parecem suficientes para representar todas as formas de vida (BOYER *et al.*, 2010).

Baseando-se nos resultados obtidos com os estudos citados acima, Boyer *et al.* (2010), montaram uma árvore filogenética baseada na análise dos genes para o TFIIB (Fig. 11), que é ausente em *Bacteria* e um dendograma, baseado na análise de genes referentes a proteínas envolvidas com funções de processamento de DNA (genes informacionais) em vírus e organismos celulares (Fig. 12). Em ambas as figuras é possível observar a introdução de um quarto grupo, que corresponde a proposição polêmica destes autores: a existência de um quarto Domínio da vida.

Figura 11 - Árvore filogenética baseada na análise dos genes para TFIIIB.



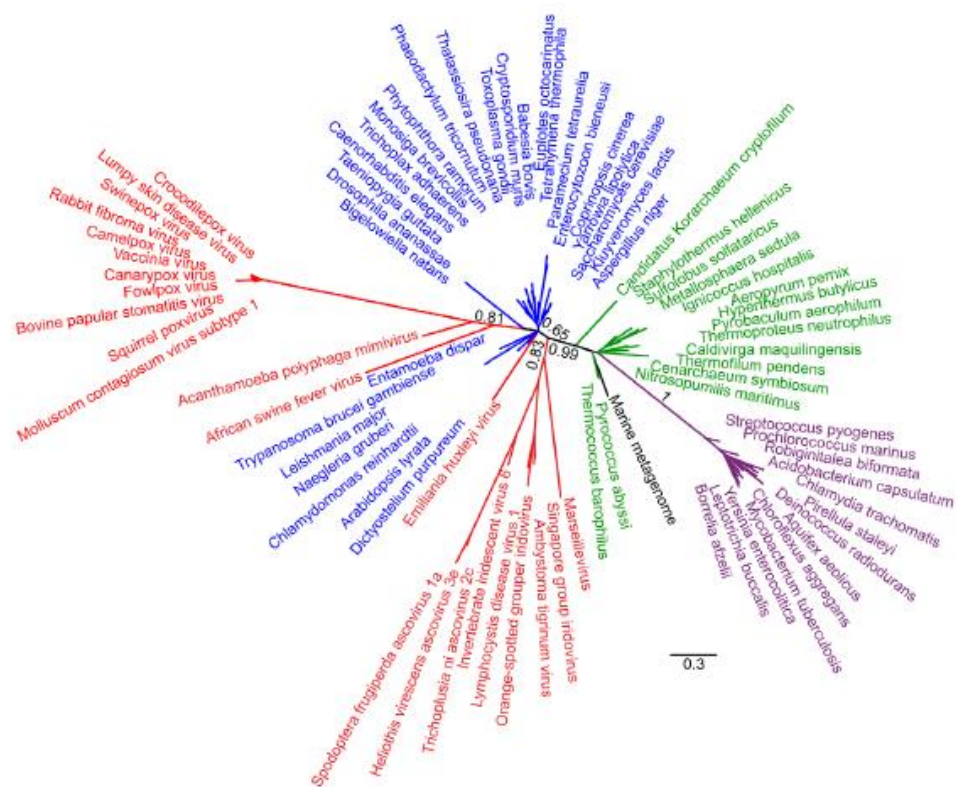
Árvore filogenética com abordagem Bayesiana que demonstra os clados para *Eukarya* (azul), *Archaea* (verde), NCLDV (vermelho) e sequências metagenômicas.

Fonte: Boyer et al., 2010.



saturação de sequências, homoplasia e heterogeneidade de composição molecular. Os resultados mostraram que os modelos originais não foram devidamente eficientes. A hipótese de que genes de NCPLV foram adquiridos por TGH de doadores dentro do Domínio *Eukarya* foi fortemente levantada. Sendo assim, os autores concluíram que não há evidências suficientes para a criação de um quarto Domínio da vida (NCPLV). Uma das árvores filogenéticas (Fig. 13) obtidas com os resultados de Williams e colaboradores, evidencia essa conclusão (WILLIAMS, EMBLEY e HEINZ, 2011).

Figura 13 - Filogenia não enraizada de RNAPII.



Árvore gerada com base na análise Bayesiana de 80 sequências de 272 aminoácidos realizada com PhyloBayes sob o modelo de CAT60. Sequências de NCPLV (vermelho) não monofiléticas, mas formam três grupos. Um ramo localizado entre *Archaea* (verde) e *Eukarya* (azul), um ramo emergente de dentro do *Eukarya* e um ramo que compreende *Emiliana huxleyi virus*.

**Fonte:** Williams, Embley e Heinz, 2011.

## 5.9 Importância ecológica

Amebas do gênero *Acanthamoeba* são ubíquas na natureza e dessa forma mimivírus podem existir em toda parte (MONIER *et al.*, 2008). O zooplâncton marinho é de grande importância na cadeia alimentar aquática, uma vez que é um grande consumidor de bactérias heterotróficas e fitoplâncton, sendo uma via importante na transferência de carbono e reciclagem de nutrientes neste ambiente. Nestes sistemas, outra presença importante é a dos vírus, que são responsáveis por infectar protistas. Porém, esses ambientes são em sua maioria, inexplorados geneticamente. A descoberta dos mimivírus em amebas de água doce e salgada, provocou um intenso debate sobre o papel ecológico deste vírus em sistemas aquáticos. Recentemente, tornou-se evidente que protistas hospedam vírus grandes e complexos e que alguns destes são patógenos de fitoplâncton, como o *Cafeteria roenbergensis virus* (*Phycodnaviridae*), que infecta um flagelado unicelular marinho clorofilado (FISCHER *et al.*, 2010).

Os mimivírus possuem estreita relação com vírus que infectam fitoplâncton e se agrupam filogeneticamente com certos vírus de algas uni e pluricelulares (MONIER *et al.*, 2008). Uma vez que já foi demonstrado que cultivos sucessivos de APMV em amebas causam uma redução drástica no genoma viral, especula-se que outros organismos poderiam ser os hospedeiros naturais deste vírus (BOYER *et al.*, 2011). Protistas unicelulares, esponjas e cnidários surgem como possíveis candidatos (CLAVERIE *et al.*, 2009).

Em 2005, Ghedin e Claverie realizaram um estudo que tinha por objetivo encontrar um local onde fosse possível procurar novas espécies da família *Mimiviridae*. Foi realizada uma busca por genes semelhantes aos de mimivírus no Mar Sargasso, seguida de análises filogenéticas. Os resultados demonstram que neste mar existem vírus de DNA que são evolutivamente próximos aos mimivírus. Várias sequências *Mimivirus-like* foram identificadas, sugerindo que vírus deste tipo são abundantes no ambiente marinho amostrado. Tais resultados são valiosos, pois o estudo complementar dessas sequências genômicas pode levar ao entendimento

da diversidade dos vírus de DNA e sobre o eventual papel deles na evolução dos eucariotos (MONIER *et al.*, 2008).

Em 2008, Monier e colaboradores realizaram um grande estudo no qual também analisaram a distribuição de sequências *Mimivirus-like* obtidas e mapeadas durante a Expedição de Amostragem Oceânica Global, bem como suas relações filogenéticas. Utilizando os genes da DNA polimerase como marcadores, os autores identificaram mais de 800 sequências virais, a grande maioria pertencente a fagos. Entretanto, o segundo grupo viral mais amostrado foi o dos NCPLV, especialmente mimivírus e phycodnavírus. Este resultado permitiu aos autores concluir que, embora os mimivírus tenham sido recentemente descobertos, eles constituem um grupo extremamente diverso, quantitativamente importante e ubíquo do ecossistema marinho. Embora em menor proporção que observado para os fagos marinhos, a lise de amebas e outros organismos em decorrência da multiplicação dos mimivírus, poderia auxiliar no fenômeno de bomba biológica de carbono, disponibilizando carbono em sua forma dissolvida em águas superficiais, e evitando a decantação e consequente aprisionamento do carbono no fundo dos oceanos (MONIER *et al.*, 2008).

## 5.10 Importância clínica

Estudos recentes demonstraram que pacientes de UTIs, imunodebilitados, e que respiram sob ajuda de aparelhos, representam um grupo de risco para agentes causadores de pneumonia associados a amebas, incluindo *Legionella pneumophila* e mimivírus (LA SCOLA *et al.*, 2005).

Raoult, La Scola e Birtles (2007) relataram três estudos realizados com o propósito de investigar a prevalência de anticorpos para mimivírus em populações humanas específicas. Em um deles foram testadas amostras de soro de 376 pacientes canadenses com pneumonia adquirida na comunidade e de 511 indivíduos saudáveis. Aproximadamente 9,7% dos pacientes com pneumonia apresentaram anticorpos contra mimivírus. O segundo estudo testou pacientes

franceses que haviam adquirido pneumonia em ambiente hospitalar e comparou os resultados obtidos com indivíduos saudáveis. Anticorpos para mimivírus foram detectados em cinco pacientes doentes, mas em nenhum saudável. O último estudo testou o soro de pacientes com pneumonia internados em UTI e comparou com um painel de antígenos de agentes convencionais causadores de pneumonia e de MPAAAs, incluindo mimivírus. Foram evidenciados 28 casos de pneumonia causados por patógenos convencionais, enquanto 18 pacientes apresentaram anticorpos contra micro-organismos associados a amebas. Destes, foi possível encontrar anticorpos anti-mimivírus em alguns pacientes, sendo mais comum entre aqueles que utilizavam ventilação mecânica.

Em um estudo similar, em 2008, Dare e colaboradores analisaram amostras respiratórias de pacientes provenientes de hospitais dos Estados Unidos. Todavia, não foram encontrados sinais de DNA de mimivírus em seus testes, utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. Segundo Didier Raoult, chefe do laboratório francês que fez a associação entre mimivírus e pneumonia, um motivo para os resultados negativos de Dare pode ser o fato das amostras de trabalho terem sido provenientes do trato respiratório superior dos pacientes. Outro estudo realizado na Austrália pelo grupo de Larcher (2006) também apresentou resultado de PCR negativo para mimivírus em todas as amostras testadas de aspirado nasofaríngeo de crianças (DARE, CHITTAGANPITCH e ERDMAN, 2008; VINCENT, LA SCOLA E PAPAIZIAN, 2010).

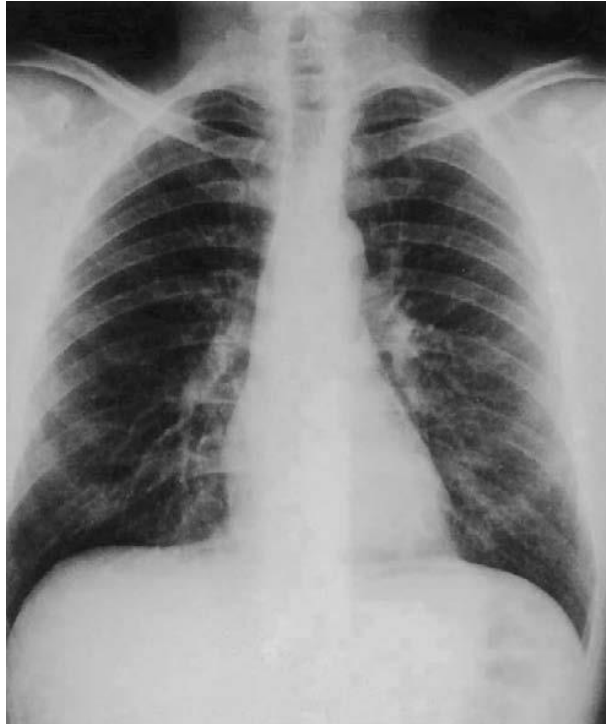
Ghigo *et al.* (2008) estudaram a infecção de mimivírus em macrófagos pela técnica de PCR em tempo real. Os autores conseguiram observar que APMV é internalizado apenas por células fagocitárias profissionais, como macrófagos e nunca por células não-fagocíticas, incluindo fibroblastos, células epeliais ou neuronais. O ciclo de infecção de APMV dentro de macrófagos também foi avaliado e foi possível concluir que o número de cópias do DNA viral aumentou significativamente com o aumento no tempo de infecção. APMV foi citopatogênico para os macrófagos e realizou ciclos de multiplicação produtivos. Diluições seriadas dos extratos de macrófagos foram inoculadas em amebas, que foram lisadas.

Com base nestes dados, que sugerem que mimivírus poderiam ser agentes etiológicos de pneumonia em humanos, pesquisadores da Faculdade de Marseille,

tentaram estabelecer um modelo animal para estudos *in vivo*. Dentre as diversas vias de infecção testadas, a via intra-cardíaca foi a mais promissora. Doze camundongos foram inoculados por esta via, e foi possível observar evidências histopatológicas de pneumonia aguda em 75% deles: espessamento de paredes alveolares com infiltração celular de leucócitos, macrófagos e linfócitos; dano alveolar difuso e presença de eritrócitos no lúmen alveolar. A partir deste material, foi possível isolar o vírus e detectar antígenos por ensaio de imunofluorescência indireta. Dessa forma, os resultados indicaram fortemente que camundongos infectados pela via intra-cardíaca poderiam servir de modelo de estudo para avaliar a patogenicidade de mimivírus (VINCENT, LA SCOLA E PAPAIZIAN, 2010).

Apesar de alguns estudos terem apresentado resultados negativos para mimivírus, Raoult, La Scola e Birtles (2007) consideram que este vírus é, de fato, um potencial patógeno humano causador de pneumonia. Entre os motivos para tal afirmação, temos: os mimivírus são parasitas de amebas, que são conhecidas como plataformas biológicas para os agentes de pneumonia; há a possibilidade de induzir a doença em camundongos inoculados experimentalmente com o vírus; estudos sorológicos demonstraram a existência de pacientes com pneumonia que apresentaram anticorpos contra mimivírus. Além disso, os autores relatam um caso de pneumonia acidental causada por mimivírus, acometendo um técnico de laboratório que trabalhava com altos títulos deste vírus (Fig. 14). Baseado nestes argumentos, Raoult e colaboradores dizem que é possível preencher todos os parâmetros do postulado de Koch, atribuindo ao mimivírus o caráter de agente infeccioso humano.

Figura 14: Radiografia de tórax



Radiografia de tórax de um técnico de laboratório infectado acidentalmente com mimivírus, mostrando infiltração basilar bilateral.

**Fonte:** Raoult, La Scola e Birtles, 2007.

Apesar disso, Raoult, La Scola e Birtles (2007) admitem que existem várias controvérsias e questões mal respondidas em relação a atuação de mimivírus como um patógeno humano. O vírus não se multiplica de forma eficaz em nenhuma cocultura com células de mamíferos testadas até o momento e seus antígenos sofrem sororeatividade aparente. Dessa forma, há a necessidade de estudos adicionais e mais abrangentes para resolver essas questões.

## 6. CONCLUSÃO

Dentre os vírus atualmente conhecidos, os mimivirus conseguem despontar como os mais complexos morfológica e geneticamente e, desta forma intrigam os virologistas, principalmente por incitarem mais perguntas do que respostas. Alguns dos vírus gigantes de DNA estão em fase inicial de descoberta e caracterização e as informações que poderão surgir nos próximos anos com as pesquisas que estão sendo realizadas acerca destes organismos poderão vir a mudar as nossas concepções atuais sobre vida, diversidade e evolução. Desta forma, buscar entender toda a complexidade que envolve os vírus gigantes é um desafio importante, que ao ser aceito e explorado poderá gerar resultados impactantes para a ciência.

## 7. PERSPECTIVAS

O fato de espécies do gênero *Acanthamoeba* serem detectadas em todos os biomas brasileiros desperta o interesse a cerca do estudo dos mimivírus no Brasil, através da prospecção em amostras de água e solo em ecossistemas brasileiros e em ambientes hospitalares, por exemplo. Além disso, a busca por métodos de estudo melhores e mais reprodutivos é fundamental para o desenvolvimento desta área. Diante disso, o conhecimento construído através desta revisão poderá servir como base para a continuação do trabalho em um futuro projeto de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOYER, M. *et al.* Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. **Proc Natl Acad Sci.** 2009. 106(51):21848–21853.

BOYER, M. *et al.* Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses. **PLoS One [online]**. 2010. 5(12):01-08.

BOYER, M. *et al.* Mimivirus shows dramatic genome reduction after intraamoebal culture. **Proc Natl Acad Sci.** 2011.108:(25):10296-10301.

CARLESSO, A.M. *et al.* Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the City of Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 2007. 40(3):316-320.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Mimivirus and its Virophage. **Annu. Rev. Genet.** 2009. 43:49–66.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses. **Trends in Genetics.** 2010. 26(10):431-437.

CLAVERIE, J.M. *et al.* Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus. **Virus Res.** 2006.117(1):133-144.

CLAVERIE, J.M. *et al.* Mimivirus and *Mimiviridae*: Giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. **J. Invertebr. Pathol.** 2009. 101(3):172-180.

COLSON, P. *et al.* The giant Cafeteria roenbergensis virus that infects a widespread marine phagocytic protist is a new member of the fourth domain of Life. **PLoS One.** 2011a. 29;6(4):01-11.

COLSON, P. *et al.* Viruses with More Than 1,000 Genes: Mamavirus, a New *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* Strain, and Reannotation of Mimivirus Genes. **Genome Biol. Evol.** 2011b. 3:737–742.

CROZETTA, M.A.S. **Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar.** 2007. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DARE, R.K.; CHITTAPANPITCH, M.; ERDMAN, D.D. Screening pneumonia patients for mimivirus. **Emerg Infect Dis.** 2008.14(3):465–467.

DESNUES, C.; RAOULT, D. Inside the lifestyle of the virophage. **Intervirology**. 2010. 53:293-303.

DUARTE, J.L. **Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba***. 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ETTEN, J.L.V.; LANE, L.C.; DUNIGAN, D.D. DNA Viruses: The Really Big Ones (Giruses). **Annu Rev Microbiol**. 2010. 13(64): 83–99.

FILÉE, J.; CHANDLER, M. Gene exchange and the origin of giant viruses. **Intervirology**. 2010. 53:354-361.

FISCHER, M.G. *et al.* Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. **Proc Natl Acad Sci**. 2010. 107(45):19508–19513.

FRITSCHÉ, T. *et al.* Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. **J. Clin. Microbiol**. 1993. 31:1122–1126.

GHEDIN, E.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus Relatives in the Sargasso Sea. **Virology Journal**. 2005. 2:62-69.

GHIGO, E. *et al.* Ameobal Pathogen Mimivirus Infects Macrophages through Phagocytosis. **PLoS Pathogens**. 2008. 4(6): 01-17.

GREUB, G., RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin Microbiol Rev**. 2004. 17(2):413-433.

JEUDY, S. *et al.* Dissecting the unique nucleotide specificity of mimivirus nucleoside diphosphate kinase. **Journal of Virology**. 2009. 83(14):7142–7150.

KLOSE, T. *et al.* The Three-Dimensional Structure of Mimivirus. **Intervirology**. 2010. 53:268-273.

KOONIN, E.V., YUTIN, N. Origin and Evolution of Eukaryotic Large Nucleo-Cytoplasmic DNA Viruses. **Intervirology**. 2010. 53:284–292.

LA SCOLA, B. *et al.* A Giant Virus in Amoebae. **Science**. 2003. 299:2033.

LA SCOLA, B. *et al.* Mimivirus in pneumonia patients. **Emerg Infect Dis**. 2005. 11:449–452.

LA SCOLA, B. *et al.* The Virophage as a Unique Parasite of the Giant Mimivirus. **Nature**. 2008. 455:100-104.

LEGENDRE, M. *et al.* mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Res**. 2010. 20: 664-674.

- LEGENDRE, M. *et al.* Breaking the 1000-gene barrier for Mimivirus using ultra-deep genome and transcriptome sequencing. **Virology Journal**. 2011. 8(99):01-06.
- MOLINER, C.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. **FEMS Microbiol Rev**. 2010. 34: 281–294.
- MONIER, A. *et al.* Marine mimivirus relatives are probably large algal viruses. **Virology Journal**. 2008. 5(12):01-08.
- MOREIRA, D.; BROCHIER-ARMANET, C. Giant viruses, giant chimeras: The multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. **BMC Evolutionary Biology**. 2008. 8(12):01-10.
- MUTSAFI, Y. *et al.* Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. **P Proc Natl Acad Sci**. 2010. 107(13):5978–5982.
- RAOULT, D. The Journey from Rickettsia to Mimivirus. **ASM News**. 2005. 71(6):278-284.
- RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; BIRTLES, R. The Discovery and Characterization of Mimivirus the Largest Known Virus and Putative Pneumonia Agent. **Clin Infect Dis Jour**. 2007. 45:95-102.
- RAOULT, D.; BOYER, M. Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. **Intervirology**. 2010. 53:321-329.
- RUIZ-SAENZ, J.; RODAS, J.D. Viruses, virophages, and their living nature. **Acta virologica**. 2010. 54: 85-90.
- SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolation of potentially pathogenic free-living amoebae in hospital dust. **Rev Saúde Pública**. 2003. 37(2):242-246.
- SUN, S. *et al.* Structural Studies of the Sputnik Virophage. **Journal of Virology**. 2010. 84(2): 894–897.
- SUZAN-MONTI, M. *et al.* Ultrastructural Characterization of the Giant Volcano-like Virus Factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **PLoS One [online]**. 2007. 2(3):01-11.
- SUHRE, K. Gene and Genome Duplication in *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **Journal of Virology**. 2005. 79(22):14095–14101.
- XIAO, C. *et al.* Structural Studies of the Giant Mimivirus. **PLoS Biology**. 2009. 7(4): 958-966.
- YUTIN *et al.* Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: Clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology Journal**. 2009. 6:223:01-13.

WILLIAMS, T.A.; EMBLEY, T.M.; HEINZ, E. Informational Gene Phylogenies Do Not Support a Fourth Domain of Life for Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses. **Proc Natl Acad Sci**. 2011. 6(6):01-11.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPA ZIAN, L. Advances in Mimivirus Pathogenicity. **Intervirolgy**. 2010. 53(5):304–309.