

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

Isabella Luiza Martins de Aquino

**O ISOLAMENTO E A CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO ISOLADO  
BRASILEIRO DE MIMIVÍRUS DA LINHAGEM C SUSCITA QUESTÕES ACERCA  
DA ESTRUTURA DAS FIBRILAS DAS LINHAGENS A, B E C DE MIMIVÍRUS**

Belo Horizonte

2021

Isabella Luiza Martins de Aquino

**O ISOLAMENTO E A CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO ISOLADO  
BRASILEIRO DE MIMIVÍRUS DA LINHAGEM C SUSCITA QUESTÕES ACERCA  
DA ESTRUTURA DAS FIBRILAS DAS LINHAGENS A, B E C DE MIMIVÍRUS**

**Versão final**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Dr. Jônatas Santos Abrahão

Coorientadora: Dra. Lorena Christine Ferreira da Silva

Belo Horizonte

2021

043

Aquino, Isabella Luiza Martins de.

O isolamento e a caracterização de um novo isolado brasileiro de mimivírus da linhagem C suscita questões acerca da estrutura das fibrilas das linhagens A, B e C de mimivírus [manuscrito] / Isabella Luiza Martins de Aquino. – 2021. 69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Jônatas Santos Abrahão. Coorientadora: Dra. Lorena Christine Ferreira da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Mimiviridae. 3. Taxonomia. 4. Filogenia. I Abrahão, Jônatas Santos. II. Silva, Lorena Christine Ferreira da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ISABELLA LUIZA MARTINS DE AQUINO**

Nº REGISTRO: **2019706312**

Às 14:00 horas do dia **11 de AGOSTO de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jaqueline Germano de Oliveira (Fiocruz, Rene Rachou), Denilson Eduardo Silva Cunha (Centro de Microscopia da UFMG) e o Prof. Jônatas Santos Abrahão – Orientador, para julgar o trabalho final “O isolamento e a caracterização de um novo isolado brasileiro de mimivírus da linhagem C suscita questões acerca da estrutura das fibrilas das linhagens A, B e C de mimivírus”, da aluna **Isabella Luiza Martins de Aquino**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jônatas Santos Abrahão - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira  
Denilson Eduardo Silva Cunha

De acordo:

Prof. Jônatas Santos Abrahão  
(orientador)

Profa. Danielle da Glória de Souza  
(Coordenadora do PPGM/UFMG)

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2021

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Jonatas Santos Abrahao, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2021, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 12/08/2021, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 12/08/2021, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denilson Eduardo Silva Cunha, Biólogo**, em 12/08/2021, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0872933** e o código CRC **C999F572**.

*À minha mãe, Eriene, a maior inspiração de  
força e sabedoria que tenho. Você é a minha  
motivação para seguir minha jornada nessa  
vida e para chegar até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, que sempre priorizaram a educação e bem estar de seus filhos acima de tudo, que me deram tanto amor e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos. A memória do meu pai e seus ensinamentos me fazem continuar todos os dias. A força da minha mãe, o apoio e a confiança que deposita em mim, me tornaram a mulher que sou hoje e foi o que me impulsionou a chegar até aqui.*

*Às mulheres da minha vida, tias Marlene e Aparecida, minha avó Ilda e minha mãe Eriene, que são meu porto seguro e a minha referência de amor incondicional. Obrigada por serem esta potência e me inspirarem.*

*Aos meus tios Ivan, Rogério e Antônio e ao meu avô Oswaldo por todo o apoio e por sempre comemorarem as minhas conquistas e me ajudarem a ser minha melhor versão.*

*Aos meus primos Igor, Lucas e Flávio e meu irmão Jussel, por serem acima de tudo, meus melhores amigos durante toda a vida.*

*Ao meu amor, amigo e companheiro, Rubens, que escolheu estar ao meu lado enfrentando o mundo. Obrigada por me amar do jeito que sou, por me incentivar a cada passo, por trazer para minha vida sua família maravilhosa, por crescer ao meu lado ao longo de tantos anos e por me ensinar o que realmente significa amor.*

*Ao meu orientador, Jônatas, pela orientação impecável. Que além das diversas oportunidades proporcionadas ao me acolher no GEPVIG, acredita mais em mim do que eu mesma em muitos momentos. Por todos os desafios que propõe através dos projetos incríveis, das reuniões e por tornar nosso grupo tão coeso. Você é uma grande referência para mim e a cada dia admiro mais o seu amor pela ciência e o seu talento, não só como pesquisador, mas como professor.*

*A minha coorientadora, Lorena, que além de depositar tanta confiança em mim, me moldou a cada passo com suas palavras gentis, compreensão e sua paciência que me tranquilizava para encontrar soluções quando tudo parecia desmoronar. Sem o equilíbrio que sua personalidade e sabedoria me trazem, seria no mínimo muito mais difícil a realização deste trabalho.*

*Às minhas amigas, Tatiane, Jussara, Beatriz e Bruna, que para mim são família e que me entendem como ninguém. Obrigada por toda a alegria, incentivo e ajuda. Vocês tornaram a caminhada muito mais leve e divertida e estarão sempre no meu coração.*

*Às meninas do Tucuntecor, pela amizade e por todo o incentivo durante essa parte tão importante da minha vida. Vocês são pessoas especiais e excepcionais que me inspiram a ser cada vez melhor.*

*A todos os meus colegas do GEPVIG, que tornam nosso grupo tão dinâmico e colaborativo, o que justifica o sucesso e me enche de orgulho por fazer parte. Em especial, agradeço às*

*minhas amigas Bruna e Talita, que me ajudam tanto, são minhas companheiras e aturam minhas maluices. Não me imagino mais nessa vida sem vocês!*

*Aos colegas do Laboratório de Vírus, que me ensinaram, me acolheram tanto e me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente. Vocês são pessoas especiais que fazem o laboratório ser um sinônimo de colaboração e excelência.*

*Aos professores Cláudio, Erna, Betânia e Giliane, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Vírus e por todo o aprendizado que proporcionaram. Obrigada por serem nossos pilares e do laboratório.*

*Ao Centro de Microscopia da UFMG e seus funcionários, pelo trabalho impecável e que nos proporciona imagens maravilhosas, que enriquecem nossas pesquisas e fazem história. Agradeço pela compreensão e pela ajuda na obtenção de resultados essenciais para este trabalho em meio a uma pandemia.*

*À banca avaliadora, pela disponibilidade e oportunidade de discutir e aprimorar o trabalho ao qual me dediquei com tanto afinho.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e todas as pessoas envolvidas por trás deste programa, o qual eu sinto um imenso orgulho em fazer parte.*

*À UFMG, por toda a luta para se manter como excelência no país e no mundo e dar acesso a tantas pessoas à uma educação superior de qualidade.*

*Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro que possibilitou este trabalho e por ser peça fundamental para a ciência brasileira que tanto sofre atualmente.*

*Obrigada!*

## NOTA

A Pandemia do novo coronavírus (SARS-CoV-2) impôs uma série de restrições necessárias para a sua contenção e que afetaram totalmente meu projeto inicial de Mestrado. Sem acesso físico ao Laboratório de Vírus e demais espaços do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, não pude realizar a maior parte dos experimentos necessários para a realização da metodologia proposta no projeto original e conseqüentemente, não foi possível a obtenção de alguns resultados esperados. Dessa forma, foi necessário adequar o projeto. O presente trabalho foi realizado não só com outros vírus que não àquele inicialmente proposto, mas também demandou metodologias novas que pudessem ser realizadas remotamente. Tudo o que não foi executado em relação à metodologia proposta no projeto inicial de Mestrado permanece como perspectiva a ser realizada para o desenvolvimento de um Projeto de Doutorado.

## RESUMO

A descrição do primeiro vírus gigante de amebas em 2003, *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), impulsionou pesquisadores de todo o mundo a não só buscar por outros vírus gigantes, mas também a aprofundar os estudos acerca do APMV. Dessa forma, o grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV), ao qual estes vírus pertencem atualmente, tem se diversificado cada vez mais. Apesar de os mimivírus serem os primeiros a serem descritos, e conseqüentemente os mais estudados até então, muitas lacunas do conhecimento sobre a biologia, as relações filogenéticas e a taxonomia destes vírus ainda precisam ser preenchidas e elucidadas. Além de inferências filogenéticas baseadas em genes, neste trabalho propomos que a morfologia das fibrilas pode ser uma evidência da divisão dos mimivírus dentro de três diferentes linhagens. Utilizando metodologias como prospecção e análises *in silico* para avaliar imagens de microscopia eletrônica utilizando ferramentas de informática e para a construção de análise filogenética, descrevemos um novo isolado brasileiro de mimivírus pertencente à linhagem C, bem como estudamos mais a fundo buscando evidências que suportem a divisão dos mimivírus dentro das linhagens, A, B e C. Observamos que não só existem diferenças genômicas dentre os mimivírus de linhagem A, B e C, mas também morfológicas entre as fibrilas presentes nas partículas virais. Estas descobertas auxiliam tanto na classificação e taxonomia, quanto na construção do conhecimento acerca da biologia das partículas de mimivírus, o que pode inclusive aprimorar a identificação dos mesmos já durante o isolamento e também permitir o entendimento sobre sua ecologia e relação com o hospedeiro, uma vez que as fibrilas são importantes elementos para que os mimivírus consigam se aderir à ameba hospedeira e iniciar a infecção.

Palavras-chave: Vírus Gigante. Mimivírus. Fibrilas. Taxonomia. Prospecção.

## ABSTRACT

The description of the first giant amoeba virus in 2003, *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), spurred researchers around the world to not only search for other giant viruses, but also to deepen their studies on the APMV. Thus, the group of Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses (NCLDV), to which these viruses currently belong, has become increasingly diversified. Although mimiviruses were the first to be described, and consequently the most studied so far, many gaps in knowledge about the biology, phylogenetic relationships and taxonomy of these viruses still need to be filled and elucidated. In addition to gene-based phylogenetic inferences, in this work we propose that fibril morphology may be evidence of the division of mimiviruses into three different lineages. Using methodologies such as prospecting and *in silico* analysis to assess electron microscopy images using computer tools and to construct phylogenetic analysis, we describe a new Brazilian isolate of mimivirus belonging to the C lineage, as well as study further, seeking evidence to support the division of mimiviruses within lineages A, B and C. We observed that there are not only genomic differences among the lineage A, B and C mimiviruses, but also morphological differences between the fibrils present in the viral particles. These discoveries help both in classification and taxonomy, as well as in the construction of knowledge about the biology of mimivirus particles, which can even improve their identification already during isolation and also allow the understanding of their ecology and relationship with the host, since fibrils are important elements for mimiviruses to be able to adhere to the host amoeba and initiate the infection.

Keywords: Giant Virus. Mimivirus. Fibrils. Taxonomy. Prospecting.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Coloração de Gram de uma ameba infectada com mimivírus.....   | 19 |
| <b>Figura 2</b> – A diversidade morfológica de vírus gigantes de ameba.....   | 23 |
| <b>Figura 3</b> – O menor e o maior vírus gigante de amebas já isolado: yaravírus e tupanvírus.....                   | 25 |
| <b>Figura 4</b> – Partícula de um mimivírus.....  | 26 |
| <b>Figura 5</b> – Reconstrução tridimensional ilustrando uma partícula de mimivírus.....                              | 26 |
| <b>Figura 6</b> – Imagens da superfície de fibrilas de um mimivírus.....  | 27 |
| <b>Figura 7</b> - Ciclo de multiplicação de um mimivírus.....   | 29 |
| <b>Figura 8</b> - As diferentes aparências das fibrilas de mimivírus pertencentes às linhagens A, B e C.....          | 31 |
| <b>Figura 9</b> - Clados da família <i>Mimiviridae</i> .....  | 32 |
| <b>Figura 10</b> – Efeitos citopáticos em células de amebas <i>A. castellanii</i> infectadas com megavírus 19.10..... | 47 |
| <b>Figura 11</b> - Partícula do novo isolado, o megavírus 19.10.....  | 48 |
| <b>Figura 12</b> - Curva de ciclo único do curso da multiplicação do megavírus 19.10.....                             | 49 |
| <b>Figura 13</b> - Etapas iniciais do ciclo de multiplicação do megavírus 19.10.....                                  | 50 |
| <b>Figura 14</b> - Etapas finais do ciclo de multiplicação do megavírus 19.10.....                                    | 51 |
| <b>Figura 15</b> - Filogenia do megavírus 19.10 e outros vírus relacionados à família <i>Mimiviridae</i> ..           | 52 |
| <b>Figura 16</b> – Diferenças morfológicas das fibrilas de mimivírus das linhagens A, B e C.....                      | 53 |
| <b>Figura 17</b> - Painel de imagens de mimivírus das linhagens A, B e C.....   | 54 |
| <b>Figura 18</b> - Trios ou duplas de mimivírus das diferentes linhagens em uma mesma amostra....                     | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Reagentes utilizados para a confecção do meio PYG..... | 66 |
| <b>Tabela 2</b> – Disciplinas cursadas ao longo do mestrado.....         | 68 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**µl** – Microlitro

**µm** – Micrômetros

**aaRS** - aminoacil-tRNA sintetase

**APMV** – Acanthamoeba polyphaga mimivírus

**cm<sup>2</sup>** - Centímetros quadrados

**CME** – Crio-microscopia eletrônica

**CM-UFMG** – Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais

**FV** - Fábrica viral

**G-C** – Guanina-Citosina

**GEPVIG** – Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes

**h.p.i** – Horas pós-infecção

**ICTV** - *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus)

**kpb** – Quilopares de base

**m.o.i** – *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

**Mb** – Megabases

**MCP** – *Major Capsid Protein* (Proteína principal do capsídeo)

**mCP** – *Minor Capsid Protein* (Proteína secundária do capsídeo)

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MFA** – Microscopia de força atômica

**mg** – Miligrama

**min** – Minuto

**mL** – Mililitro

**NCLDV** – *Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses* (Vírus Grandes Núcleo- Citoplasmáticos de DNA)

**nm** - Nanômetros

**nt** – Nucleotídeos

**ORFs** – *Open Reading Frames* (Fases abertas de leitura)

**p/v** – Peso/volume

**pb** – Pares de bases

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PYG** – *Peptone-Yeast extract-Glucose* (Peptona-Extrato de levedura-Glicose)

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**RNA<sub>r</sub>** – RNA ribossomal

**RNA<sub>t</sub>** – RNA transportador

**rpm** – Rotações por minuto

**SisGen** – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

**VG** – Vírus gigante

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>17</b> |
| 1.1 Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV).....                                  | 17        |
| 1.2 A descoberta dos vírus gigantes .....  | 18        |
| 1.3 A expansão dos isolados de vírus gigantes de amebas .....                                | 20        |
| 1.4 Contribuição dos estudos brasileiros para a expansão dos vírus gigantes de amebas .....  | 23        |
| 1.5 Os mimivírus .....   | 25        |
| 1.5.1 Estrutura da partícula viral .....   | 25        |
| 1.5.2 Ciclo de multiplicação .....   | 27        |
| 1.5.3 Filogenia .....  | 30        |
| 1.5.4 Genoma.....  | 32        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>4 FLUXOGRAMA</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>39</b> |
| 5.1 Cultivo celular .....  | 39        |
| 5.2 Isolamento viral .....   | 40        |
| 5.3 Produção dos estoques virais.....  | 41        |
| 5.3.1 Vírus utilizados no trabalho.....  | 41        |
| 5.3.2 Multiplicação e purificação viral.....   | 41        |
| 5.3.3 Titulação viral.....   | 42        |
| 5.4 Caracterização morfológica do isolado e de seu ciclo.....                                | 43        |
| 5.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....   | 43        |
| 5.4.2 Curva de ciclo único .....   | 44        |
| 5.5 Análises comparativas da morfologia das fibrilas de mimivírus.....                       | 44        |
| 5.6 Análise Filogenética .....   | 45        |
| 5.6.1 Obtenção de gene alvo: sequenciamento, montagem e predição de genoma.....              | 45        |
| 5.6.2 Filogenia .....  | 45        |
| <b>6 RESULTADOS</b> .....  | <b>47</b> |
| 6.1 Isolamento e caracterização morfológica do isolado e de seu ciclo de multiplicação ..... | 47        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.1.1 Isolamento e morfologia das partículas virais .....  | 47        |
| 6.1.2 Caracterização do ciclo de multiplicação do Megavírus 19.10 .....                              | 48        |
| 6.2 Filogenia .....  | 51        |
| 6.3 Análises comparativas das fibrilas de mimivírus .....  | 53        |
| <b>7 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>8 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>60</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>66</b> |
| Anexo 1 - Protocolo de preparação do meio de cultura peptona/extrato de levedura/glicose (PYG) ..... | 66        |
| Anexo 2 - Disciplinas e carga horária cursadas durante o mestrado .....                              | 68        |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV)

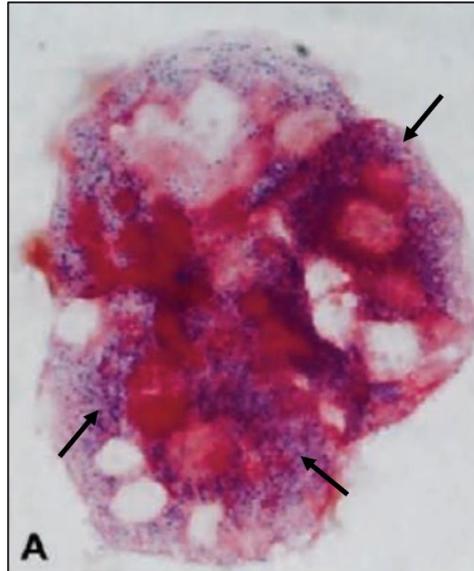
Os vírus são seres extremamente diversos e abundantes, capazes de parasitar quase todas as formas de vida encontradas no planeta Terra (KOONIN *et al.*, 2020). O conceito de vírus considerou esses organismos por muitos anos como ultramicroscópicos e incapazes de serem retidos em filtros com poros de 0,2 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), não visíveis em microscopia óptica, capazes de carregar apenas um tipo de ácido nucleico em sua partícula (DNA ou RNA) e incapazes de produzir energia ou traduzir e transcrever o genoma utilizando aparatos próprios (LWOFF, 1957; RAOULT; FORTERRE, 2008). Portanto, os vírus foram caracterizados durante anos com base na ausência de características encontradas em organismos celulares e por seu tamanho ultramicroscópico. Com a descoberta de vírus que apresentavam características diferentes daquelas estabelecidas pelo conceito tradicional de vírus, surgiram questionamentos acerca destes paradigmas. O grupo dos vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV) é um grupo que engloba diferentes vírus, os quais podem apresentar partículas maiores medindo mais que 150 nanômetros (nm), genomas de DNA fita dupla com mais de 100.000 pares de base (pb), ciclo de multiplicação que ocorre inteiramente no citoplasma ou que comece no núcleo e termine no citoplasma celular do hospedeiro. (IYER *et al.*, 2006; KOONIN; YUTIN, 2019, COLSON *et al.*, 2012). Estes vírus possuem uma gama de hospedeiros muito diversa, se relacionando com algas, humanos, répteis, aves, insetos, mamíferos e animais invertebrados (KOONIN; YUTIN, 2019). Inicialmente, este grupo monofilético abrigava as famílias *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae* e *Phycodnaviridae*. Foi sugerido que esse grupo possui um ancestral comum após um estudo que abrangia nove genes compartilhados entre essas famílias, além de outros 22 genes presentes em pelo menos três delas (IYER; ARAVIND; KOONIN, 2001). Porém, os NCLDV ganharam mais destaque com o isolamento do primeiro vírus gigante de ameba, o *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), vírus que foi agrupado em uma linhagem divergente dentro desse grupo após estudos filogenéticos aprofundados, a família *Mimiviridae* (IYER *et al.*, 2006).

O isolamento do APMV chamou a atenção de virologistas e cientistas do mundo todo, proporcionando um grande interesse em estudar e isolar novos vírus gigantes (VG) de amebas, o que levou ao aumento de exemplares pertencentes aos NCLDV e tornou um grande desafio a classificação taxonômica deste grupo. Recentemente, o *International Committee on Taxonomy*

of *Viruses* (ICTV), órgão responsável pela taxonomia oficial dos vírus, reclassificou em táxons mais altos do que Ordem, chegando a formar Reinos (*Kingdom*); Domínios (*Realm*) e várias famílias virais. Assim, os vírus de DNA fita dupla foram agrupados no Domínio *Varidnaviria* e no reino *Bamfordvirae*, utilizando como característica de classificação a presença da proteína do capsídeo que apresente a estrutura de *double-jelly-roll*, como é o caso dos NCLDV. Este Reino foi dividido em dois filos, *Prepasmiviricota* e *Nucleocytoviricota*, sendo que no segundo encontram-se os NCLDV (KOONIN *et al.*, 2020). Mesmo com todas as recentes mudanças na classificação dos NCLDV, o reconhecimento das famílias dentre os vírus de ameba ainda é escasso, pois apenas *Mimiviridae* e *Marseilleviridae* são reconhecidas como oficiais pelo ICTV até então. Assim, notamos a necessidade de estudos mais aprofundados de outros grupos de *Nucleocytoviricota* já descritos, para uma melhor compreensão e classificação dos mesmos, preenchendo uma importante lacuna de conhecimento acerca destes vírus.

## 1.2 A descoberta dos vírus gigantes de amebas

Quebrando paradigmas acerca da definição de vírus, a descoberta do APMV, o primeiro vírus gigante de ameba isolado no mundo, gerou várias discussões a respeito da origem, evolução e diferenciação entre os vírus e os organismos vivos. O APMV foi isolado de uma amostra de água de uma torre de resfriamento de um hospital de Bradford, Inglaterra, que foi coletada durante um surto de pneumonia. Após observação em microscópio óptico e coloração de Gram das amebas infectadas, estes vírus foram inicialmente identificados como bactérias Gram-positivas (Figura 1) e nomeados como “os cocos de Bradford”, por apresentarem morfologia similar a bactérias do tipo cocos e ao local de coleta das amostras. Porém, as técnicas comumente utilizadas para isolar, cultivar e identificar geneticamente esse tipo de bactéria não funcionavam com esse microrganismo, o que gerou dúvidas sobre a sua natureza novamente (LA SCOLA *et al.*, 2003, SUZAN-MONTI; LA SCOLA; RAOULT, 2006).



**Figura 1 - Coloração de Gram de uma ameba infectada com mimivírus.** As partículas roxas indicadas pelas setas pretas dentro da ameba correspondem a partículas de mimivírus mimetizando bactérias Gram-positivas do tipo cocos após coloração de Gram (que foram chamados de cocos de Bradford). **Fonte:** Adaptado de RAOULT; LA SCOLA; BIRTLES, 2007, p.97

Após 11 anos, pesquisadores franceses estudaram melhor essas amostras utilizando imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão e observaram estruturas icosaédricas típicas de vírus medindo cerca de 600 nm, bem como ciclo de multiplicação no citoplasma da célula hospedeira com uma fase de eclipse, fase do ciclo na qual partículas virais não são observadas na célula hospedeira, que é uma característica típica de vírus (LA SCOLA *et al.*, 2003; ROLLAND *et al.*, 2019). Além disso, o sequenciamento do genoma confirmou que se tratava mesmo de um vírus que apresentava genoma imensamente maior do que o típico de organismos virais, com quase 1,2 milhão de pares bases (pb) (RAOULT *et al.*, 2004). Esse foi o primeiro integrante da primeira família de vírus gigantes de amebas, a família *Mimiviridae*, que recebeu o nome de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, por ter sido encontrado associado a amebas da espécie *Acanthamoeba polyphaga* e por sua capacidade de mimetizar bactérias (“mimivírus” vem do inglês, *mimicking microbe*) (LA SCOLA *et al.*, 2003).

A descoberta de um vírus que apresenta tantas características únicas estimulou debates acerca da definição clássica de vírus. As peculiaridades dos mimivírus não permitiam que esses organismos se encaixassem nessa definição, principalmente devido ao tamanho de seu genoma, de sua partícula e ao conteúdo gênico inusitado, trazendo a necessidade de se repensar a definição, uma vez que as metodologias com o objetivo de identificar e isolar novos vírus e que

sempre consideraram essa definição acabavam impedindo a descoberta de vírus com fenótipos diferentes do proposto (COLSON *et al.*, 2018).

A descoberta dos vírus gigantes também reacendeu discussões antigas a respeito da origem e da evolução dos vírus. A divisão da árvore da vida em três Domínios (*Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*), baseada na presença de genes que codifiquem RNA ribossomal, exclui os vírus dessa divisão (WOESE, 1977). Alguns pesquisadores propõem a criação de um quarto Domínio da vida, que teria originado os vírus que pertencem ao grupo dos NCLDV, baseado em estudos utilizando sequências de genes relacionados ao aparato transcricional e traducional destes vírus e na alegação de que a presença de RNA ribossomal não é suficiente para representar todas as formas de vida (BOYER *et al.*, 2010). Dessa forma, os NCLDV teriam se originado unicamente de seres celulares mais complexos e ao longo da evolução, teriam perdido alguns genes. Porém, existe também a hipótese de que os vírus gigantes e os genes de NCLDV tenham se originado na verdade de organismos mais simples, que adquiriram maior complexidade através da aquisição de genes durante a evolução (YUTIN; WOLF; KOONIN, 2014). Existe ainda aqueles que sugerem a divisão entre dois grandes grupos não naturais: os organismos codificadores de ribossomos e os codificadores de capsídeo, sendo que os Domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* seriam incluídos no primeiro grupo e os vírus no segundo grupo (RAOULT; FORTERRE, 2008).

O interesse crescente pela descoberta de novos vírus gigantes e por análises genômicas e filogenéticas sobre esses organismos propulsionou o desenvolvimento de novas estratégias para o isolamento e estudo acerca desses vírus. Dessa forma, o número de vírus gigantes conhecidos e de estudos biológicos, moleculares e filogenéticos relacionados a eles vem crescendo atualmente (BOUGHALMI *et al.*, 2013; PAGNIER *et al.*, 2013; LEGENDRE *et al.*, 2014).

### 1.3 A expansão dos isolados de vírus gigantes de amebas

Após a descoberta do APMV, novas técnicas de isolamento foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, permitindo assim novos isolamentos e a expansão do conhecimento acerca destes novos vírus (PAGNIER *et al.*, 2013; KHALIL; ANDREANI; LA SCOLA, 2016). Desde então, não só vírus com características similares aos mimivírus e pertencentes à família *Mimiviridae* foram isolados, mas também outros tão peculiares quanto e que diversificam este grupo.

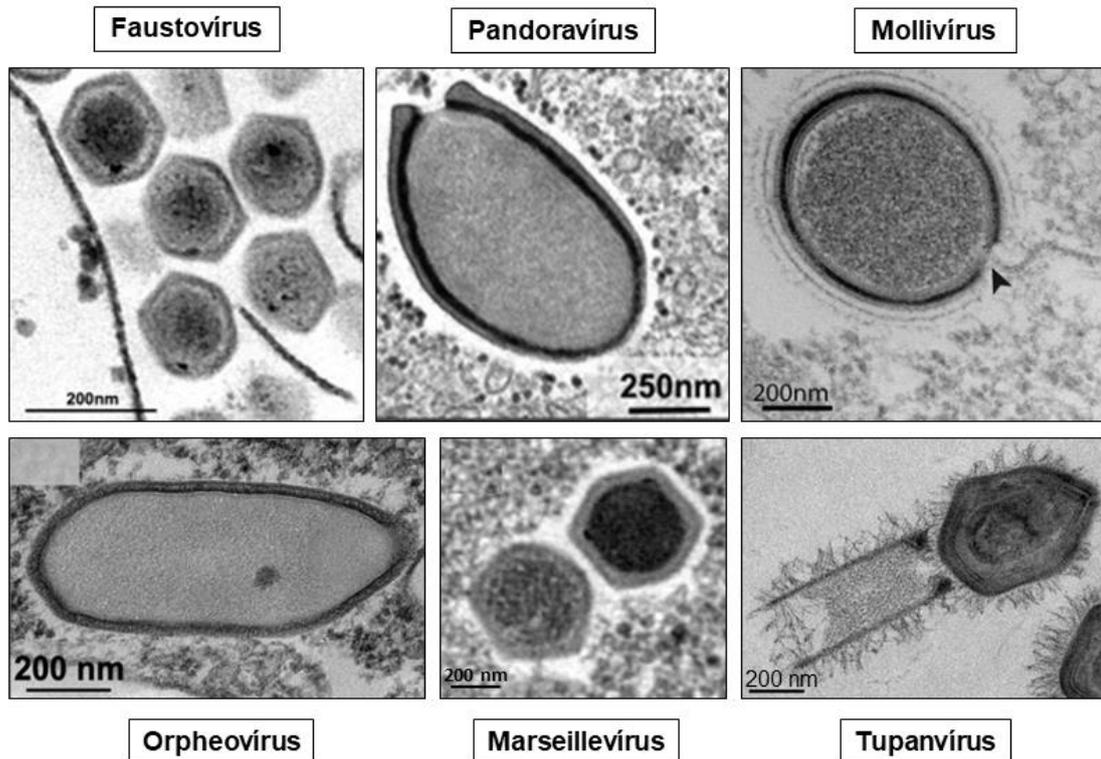
Utilizando amebas *Acanthamoeba spp.*, plataforma pioneira, foram isolados vírus com morfologias, conteúdo genômico, tamanho e características diversas. Os marseillevírus se destacam por serem menores em comparação aos mimivírus e foram isolados pela primeira vez na França em 2009 (BOYER *et al.*, 2009). Com partículas virais icosaédricas com 250 nm de comprimento e um genoma de aproximadamente 368 quilobases (kb) que possui genes conservados dentre os NCLDV, análises filogenéticas foram feitas e mostraram que o marseillevírus se tratava de mais um vírus gigante de amebas, mas que se encaixaria em uma nova família, a família *Marseilleviridae* (BOYER *et al.*, 2009). Outro vírus gigante que foi isolado em amebas do gênero *Acanthamoeba* e que apresenta partículas menores, é o pacmanvírus (ANDREANI *et al.*, 2017). Além deles, os medusavírus foram isolados a partir de amostras de água termal do Japão, apresentando partículas também icosaédricas medindo cerca de 260 nm, que exibem externamente em seu capsídeo pequenas estruturas “spike” e utilizam o núcleo da ameba hospedeira para replicar seu DNA (YOSHIKAWA *et al.*, 2019). Por fim, o isolamento e descrição mais recente de um vírus gigante utilizando essa plataforma até o presente estudo, se deu no ano de 2021, o cotonvírus japonicus. O cotonvírus também apresenta partículas virais icosaédricas, um grande genoma composto por uma molécula de DNA fita dupla linear de 1,47 Mb e foi proposto que ele faça parte da família *Mimiviridae*, porém compondo uma nova linhagem da subfamília *Megavirinae* (TAKAHASHI *et al.*, 2021).

Além de vírus com a marcante característica de apresentar partículas com formato icosaédrico, o isolamento de vírus gigantes com morfologias peculiares evidencia a diversidade destes na virosfera. O isolamento do pandoravírus em 2013, que apresenta partícula ovoide que pode atingir até 1 µm e genoma de 2,7 megabases (Mb), permitiu que este destronasse o mimivírus como o vírus de maior partícula e maior genoma do mundo, e mostrou que dar continuidade às pesquisas sobre estes organismos poderia trazer muitas novas descobertas (PHILIPPE *et al.*, 2013). Ao prospectar amostras coletadas de *permafrost* da Sibéria, datadas de 30.000 anos atrás, pesquisadores isolaram e descreveram novos VGs, o pithovírus (LEGENDRE *et al.*, 2014) e o mollivírus (LEGENDRE *et al.*, 2015). Ambos não apresentam a clássica morfologia icosaédrica, sendo os pithovírus ovoides e chegando a alcançar 1,5 µm de diâmetro e os mollivírus esféricos medindo entre 500 e 600 nm (LEGENDRE *et al.*, 2014 e 2015). Além desses dois, o cedratvírus igualmente grande e com partículas não icosaédricas foi descrito pela primeira vez em 2016, podendo alcançar até 1,2 µm de tamanho das partículas virais e apresentando dois *corks* ou ostíolos nas extremidades da partícula, por onde seu genoma é liberado durante o desnudamento no ciclo de multiplicação (ANDREANI *et al.*, 2016).

As novas descobertas levaram os pesquisadores a buscarem novas plataformas de isolamento que não fossem amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, que comumente foram e ainda são utilizadas amplamente com essa finalidade e que se mostram excelentes plataformas tanto pelo cultivo fácil e de baixo custo, quanto pela diversidade de vírus que já foram descritos utilizando-as. A *Vermamoeba vermiformis* (VV) foi a primeira ameba diferente a ser utilizada para isolamento de VG de amebas com sucesso.

Cinco vírus diferentes foram isolados utilizando a técnica de prospecção em VV: faustovírus, kaumoebavírus, orpheovírus, fadolivírus e yasminevírus. Os faustovírus e kaumoebavírus são vírus bem menores, se comparados com a maioria dos VGs descritos, possuindo partículas icosaédricas com um tamanho médio que varia de 200 a 250 nm e que foram isolados de amostras de esgoto coletadas na França e no Senegal (RETENO *et al.*, 2015, BAJRAI *et al.*, 2016a). Estes vírus são proximamente relacionados aos asfarvírus e estudos anteriores mostram um possível compartilhamento de motivos promotores ricos em A-T entre eles, reforçando esta relação filogenética (OLIVEIRA *et al.*, 2018). O orpheovírus apresenta partículas de morfologia ovoide que pode chegar a 1,3 µm, exibindo em uma de suas extremidades um ostíolo que funciona como estrutura de entrega do material genético do vírus durante o ciclo de multiplicação (ANDREANI *et al.*, 2018). O fadolivírus se encontra em caracterização atualmente, apesar de seu isolamento já ter sido citado (ROLLAND *et al.*, 2019), bem como sua relação próxima aos klosneuvírus e a informação de possuir um genoma de 1.595 Mb (SCHULZ *et al.*, 2020). A última e mais recente descrição de VG isolado em VV, o yasminevírus, tem como característica marcante o maior e mais complexo genoma dentre os vírus já isolados nesta plataforma (2,1 Mb), apesar de apresentar partículas de ~330 nm (BAJRAI *et al.*, 2019). A figura 2 ilustra a diversidade de isolados aqui citada.

Além de todos os organismos citados aqui, dois vírus muito diferentes de tudo que se conhecia até então sobre VGs foram isolados no Brasil, tupanvírus e yaravírus, surpreendendo e intrigando pesquisadores em todo mundo e que serão descritos com mais detalhes no tópico a seguir.



**Figura 2 - A diversidade morfológica dos vírus gigantes de ameba.** Imagens geradas por microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a diversidade morfológica das partículas virais que podemos encontrar dentre os vírus gigantes de amebas. **Fonte:** Adaptado de BOYER *et al.*, 2009; ABERGEL; LEGENDRE; CLAVERIE, 2015; ABRAHÃO *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2019, BORGES *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019.

#### 1.4 A contribuição dos estudos brasileiros para a expansão dos vírus gigantes de amebas

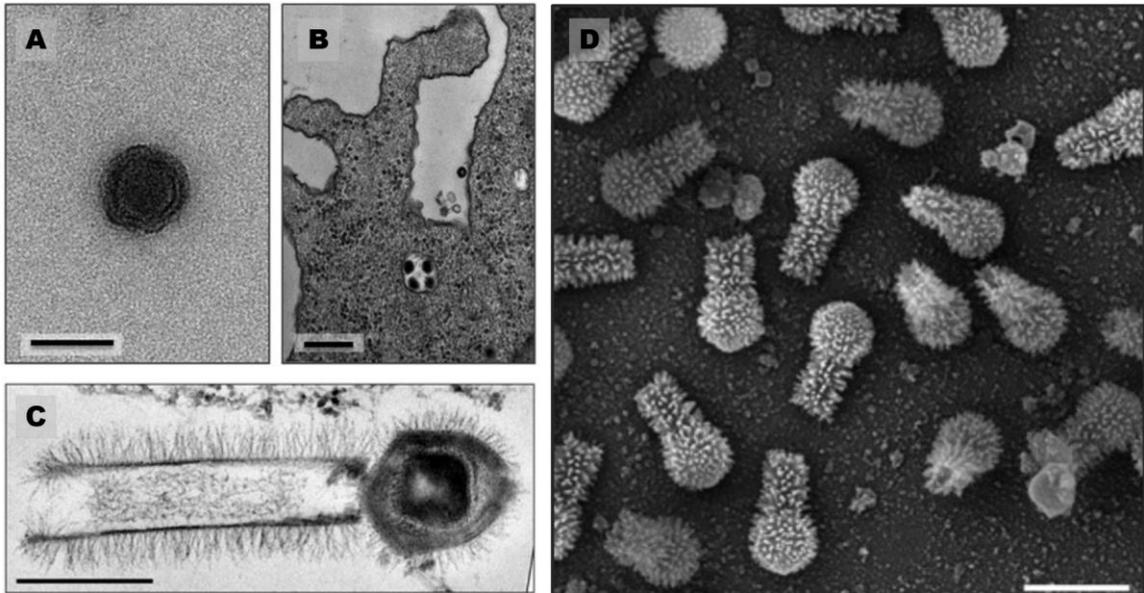
O Brasil é um país mundialmente conhecido pela sua natureza exuberante e biodiversidade. Quase todos os vírus gigantes já isolados no mundo possuem pelo menos um isolado brasileiro, evidenciando que a nossa biodiversidade viral não foge à regra. Em relação à prospecção e aos estudos destes organismos no Brasil e nas Américas, o Grupo de estudo e prospecção de vírus gigantes (GEPVIG) é pioneiro. Além do isolamento e caracterização de diversos mimivírus e vírus gigantes já isolados em outros países, o GEPVIG é o responsável pelo primeiro isolamento de dois vírus que podem ser classificados atualmente como o maior e o menor vírus capazes de infectar amebas, além de extremamente complexos e diferentes.

O primeiro isolado brasileiro foi o sambavírus, um mimivírus de linhagem A isolado a partir de amostras de água coletadas do Rio Negro, na floresta amazônica brasileira, a maior floresta do planeta Terra (CAMPOS *et al.*, 2014). Associado a esse vírus, encontraram um vírus menor capaz de infectá-lo, um virófago, que recebeu o nome de virófago Rio Negro, o primeiro isolado no Brasil (CAMPOS *et al.*, 2014). Essa descoberta levou à busca por novos VGs, culminando no isolamento de outros mimivírus, marseillevírus, pandoravírus, cedratvírus,

faustovírus e orpheovírus (DORNAS *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018a; ANDRADE *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Porém, dentre todos os isolados do GEPVIG, dois se destacam: os tupanvírus e o yaravírus.

Dois tupanvírus foram isolados, sendo cada um proveniente de uma amostra diferente. Uma delas foi coletada de uma lagoa salina do pantanal brasileiro e outra de sedimento localizado a 3.000 metros de profundidade no Oceano Atlântico (ABRAHÃO *et al.*, 2018). Estes vírus apresentam partículas únicas (Fig. 3 C-D), que além de um capsídeo icosaédrico possuem também uma cauda que confere um comprimento de até 2,3 µm, tornando-os os maiores vírus já descritos no mundo. O genoma destes vírus também é extenso, chegando a apresentar tamanho máximo de até 1,51 Mb. Além disso, seu aparato traducional composto por vários fatores de tradução e maturação de RNA, bem como 70 tipos de RNA transportadores (RNAt) e 20 aminoacil-tRNA sintetases (aaRS), também é considerado atualmente como o maior da virosfera (ABRAHÃO *et al.*, 2018). Mas as singularidades destes vírus não param por aí, já que eles são capazes de infectar tanto amebas *Acanthamoeba* spp., quanto *Vermamoeba* spp., possuindo um maior espectro de hospedeiros do que o da maior parte dos VGs já descritos. Eles são relacionados proximamente aos mimivírus, porém, análises filogenéticas sugerem que eles devam ser classificados dentro de um novo gênero da família *Mimiviridae*, o proposto gênero *Tupanvirus* (RODRIGUES *et al.*, 2018b).

Além do maior vírus descrito no mundo, os pesquisadores brasileiros também isolaram e caracterizaram o menor vírus que infecta amebas. O yaravírus brasiliensis (Fig. 3 A-B) apresenta partículas e genoma muito menores do que aqueles comuns aos VGs de amebas, com aproximadamente 80 nm e 44 kb, respectivamente. Além disso, 80% dos genes que compõem seu genoma são desconhecidos e os *core genes* compartilhados entre os NCLDV não estão presentes, tornando-os um grande mistério (BORATTO *et al.*, 2020). Este vírus distinto foi isolado de amostras de água coletadas da Lagoa da Pampulha, cartão postal da cidade de Belo Horizonte- MG, e sua classificação taxonômica permanece em debate devido às suas peculiaridades e novidades (BORATTO *et al.*, 2020).

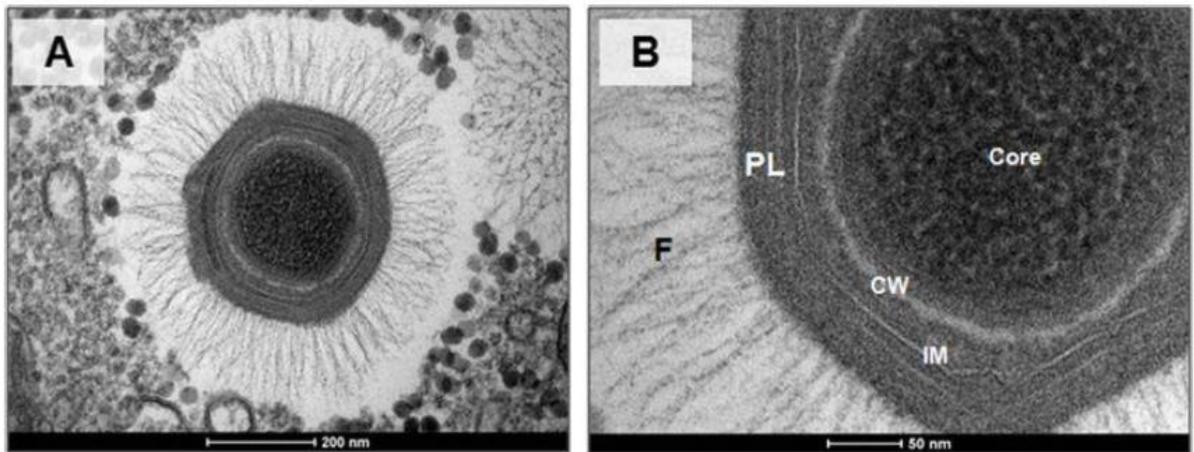


**Figura 3 - O menor e o maior vírus de amebas já isolados: yaravírus e tupanvírus.** (A) Imagem de contrastação negativa da partícula do yaravírus brasiliensis (barra de escala: 100 nm). (B) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de múltiplas partículas de yaravírus dentro de uma vesícula endossomal após a fagocitose pela ameba hospedeira (barra de escala: 250 nm). (C) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da partícula de um tupanvírus (barra de escala: 200 nm). (D) Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando várias partículas de tupanvírus (barra de escala: 1  $\mu$ m). **Fonte:** Adaptado de ABRAHÃO *et al.*, 2018 e BORATTO *et al.*, 2020.

## 1.5 Os mimivírus

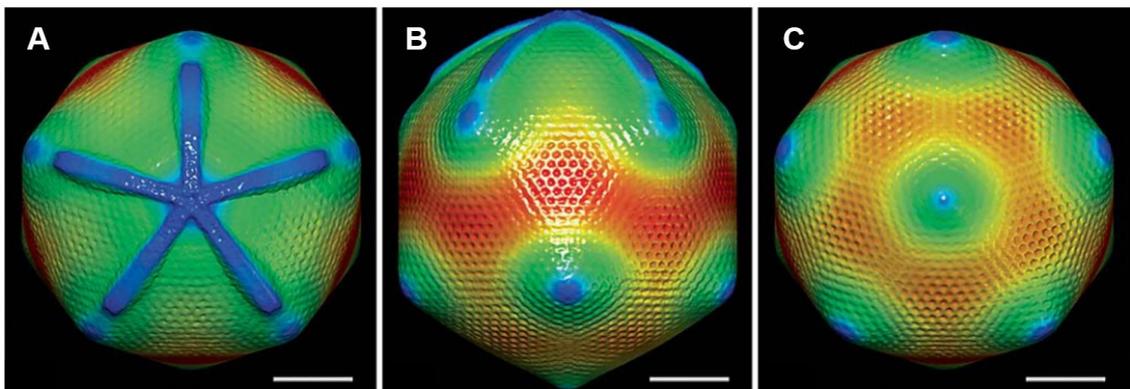
### 1.5.1 Estrutura da partícula viral

O primeiro mimivírus a ser descoberto chamou muita atenção não apenas pelo seu grande tamanho de partícula e genoma quando comparado à maioria dos vírus que conhecemos, mas também pela aparência complexa de sua partícula viral. O APMV, primeiro isolado da família *Mimiviridae*, possui uma partícula viral com um tamanho médio de 750 nm. Essa partícula de tamanho exorbitante é composta por um capsídeo protéico com simetria pseudoicosáedrica recoberto por uma camada densa de fibrilas externas (Fig. 4 A) (XIAO *et al.*, 2005, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2014). A estrutura do capsídeo é formada por várias camadas, sendo possível identificar uma membrana lipídica cercada por pelo menos três camadas de proteínas (Fig. 4 B). Na parte mais interna da membrana lipídica existe um cerne ou *core* protéico, onde está localizado o genoma viral (Figura 4 B) (XIAO *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2014a).



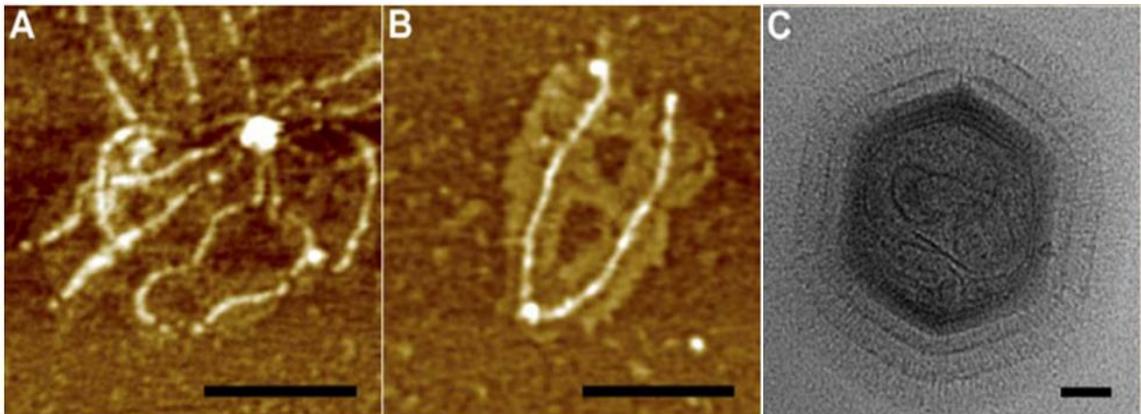
**Figura 4 - Partícula de um mimivírus.** (A) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão fornecendo uma visão geral da partícula, onde é possível observar todas as estruturas que a compõem. (B) Aproximação da imagem anterior detalhando as fibrilas (F), a camada lipoproteica do capsídeo (PL), a membrana interna do capsídeo (IM) e a região que carrega o genoma viral (Core), delimitado pela membrana interna (CW). **Fonte:** Adaptado de ABRAHÃO *et al.*, 2014.

A principal proteína que forma a estrutura do capsídeo dos mimivírus é a L425, a qual nomeamos de proteína principal do capsídeo (MCP- *Major Capsid Protein*) (XIAO *et al.*, 2009). Em um dos vértices do capsídeo encontramos o *stargate*, uma estrutura com formato de estrela-do-mar pela qual o conteúdo interno da partícula desses vírus é liberado, sendo assim uma espécie de portal para a liberação do genoma viral (Fig. 5) (ZAUBERMAN *et al.*, 2008). O *stargate* mede cerca de 200 a 250 nm, é formado por proteínas diferentes da MCP, e curiosamente, está inserido na única região do capsídeo que não é recoberta pela camada de fibrilas (KLOSE *et al.*, 2010).



**Figura 5- Reconstrução tridimensional ilustrando uma partícula do mimivírus.** Modelo tridimensional da partícula de um mimivírus gerado por crio-microscopia eletrônica (A) Visão do vértice do capsídeo onde se localiza o portal de liberação do conteúdo interno das partículas de mimivírus, o *stargate* (destacado de azul). (B) Visão lateral e (C) visão do lado oposto ao vértice do *stargate*. Barra de escala: 100 nm. **Fonte:** Modificado de XIAO *et al.*, 2009, p.964.

As fibrilas, por sua vez, são vitais para esses organismos por agirem como estruturas de adesão viral à superfície de amebas hospedeiras. Frequentemente encontramos as fibrilas com uma de suas extremidades livre e associada a um terminal globular e a outra anexada a uma única estrutura central (Fig. 6 A) (XIAO *et al.*, 2009). Além disso, são resistentes a proteases, parecem ser recobertas por peptidoglicano (Fig. 6 B) e apresentam anéis de densidade sucessivos (Fig. 6 C). A interação entre açúcares encontrados na superfície hospedeira (manose e N-acetilglucosamina) e as fibrilas parece mediar a adesão e, conseqüentemente, permitir a fagocitose do vírus e subsequente penetração na célula hospedeira (RODRIGUES *et al.*, 2015). Elas podem ser encontradas não apenas nos mimivírus, mas também em outros vírus gigantes como os tupanvírus (ABRAHÃO *et al.*, 2018), orpheovírus (ANDREANI *et al.*, 2018), pandoravírus (PHILIPPE *et al.*, 2013), dentre outros. Logo, são encontradas em abundância na natureza dentre os VGs de amebas pertencentes ou não a família *Mimiviridae*, apresentando morfologias diversas.



**Figura 6 - Superfície de fibrilas de um mimivírus.** (A e B) Imagens de microscopia de força atômica. (A) Várias fibrilas ligadas a um centro comum e apresentando porções terminais globulares. (B) Duas fibrilas desacopladas do capsídeo cercadas por um material turvo que possivelmente indica a presença de peptidoglicano. (C) Imagem gerada por crio-microscopia eletrônica de uma partícula de mimivírus tratada com lisozima e parcialmente digerida com bromelina, evidenciando dois anéis de densidade sucessivos nas fibrilas. Barra de escala: 100 nm. **Fonte:** Modificado de XIAO *et al.*, 2009, p.965.

### 1.5.2 Ciclo de multiplicação

Para dar início a multiplicação de suas partículas virais, a primeira etapa é a adesão do mimivírus à superfície da ameba hospedeira utilizando as fibrilas que são encontradas na camada mais externa do capsídeo viral (RODRIGUES *et al.*, 2018). Após esse processo, o vírus consegue avançar para a próxima etapa, a penetração, que acontece graças à fagocitose feita

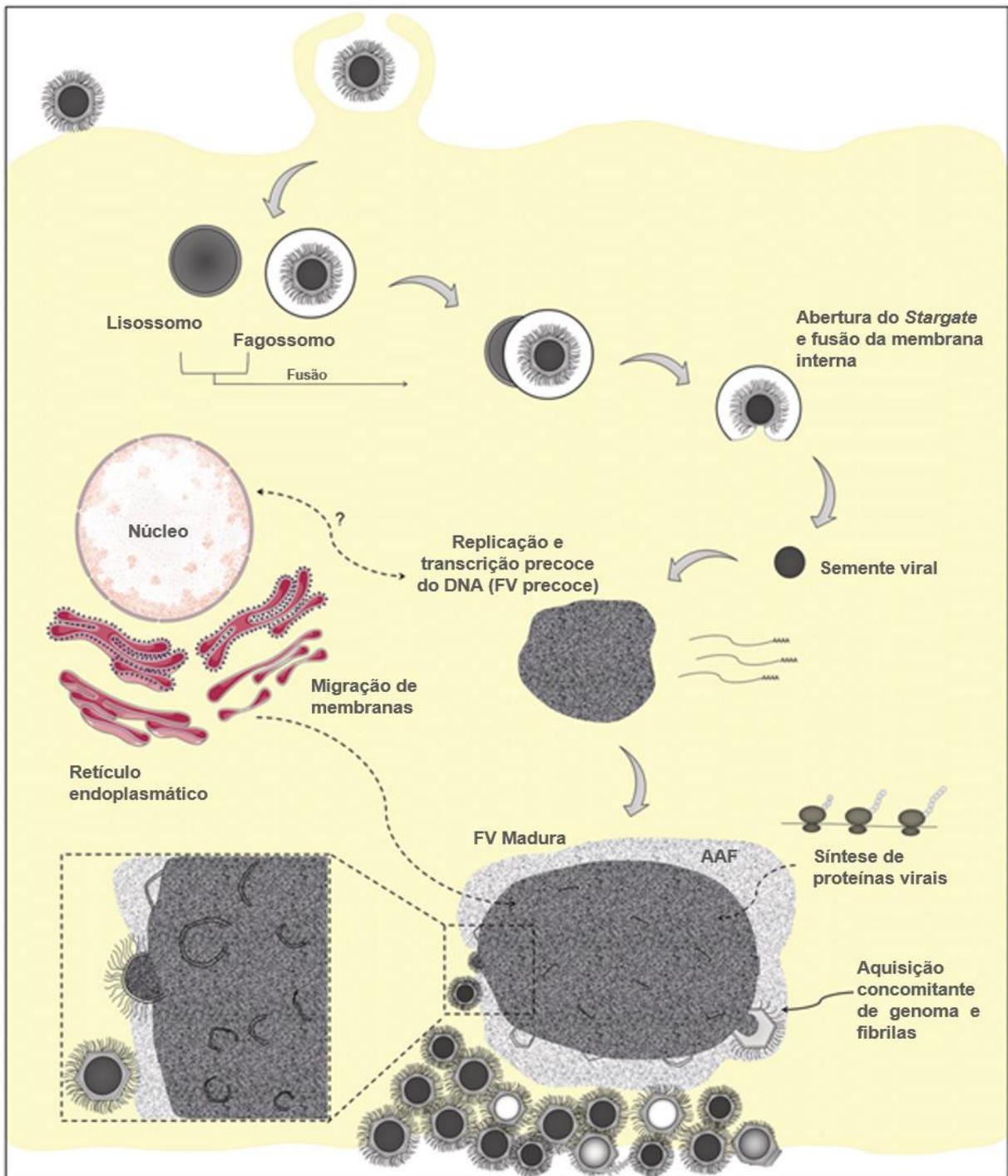
pela ameba hospedeira (via emissão de pseudópodes) e que é estimulada pelo tamanho da partícula viral (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2017).

Uma vez dentro da célula, a partícula viral será aprisionada dentro de uma vesícula, o fagossomo, e este se funde a lisossomos no citoplasma celular, promovendo a acidificação e consequente abertura do *stargate* (ANDRADE *et al.*, 2017). A abertura do *stargate* impulsiona a fusão da membrana lipídica do fagossomo com a membrana interna da partícula do mimivírus, iniciando assim o processo de desnudamento e de liberação de todo o conteúdo interno da partícula viral no citoplasma hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2017; SCHRAD *et al.*, 2020). Durante o desnudamento, não é possível detectar partículas virais dentro da célula hospedeira, já que estas encontram-se desmontadas, e este período é conhecido como fase de eclipse.

O conteúdo interno da partícula viral é chamado de semente viral e após a sua liberação o citoplasma do hospedeiro passa por uma reorganização, originando uma fábrica viral (FV) precoce (ANDRADE *et al.*, 2017). A fábrica viral é uma região elétron-densa responsável por abrigar a replicação e transcrição do DNA viral, que se iniciam com a síntese de proteínas virais, aumentando consideravelmente o tamanho da FV, podendo chegar a ocupar até 42% do citoplasma celular quando se encontra no seu ápice de maturação (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007). É dentro das FVs que a morfogênese das partículas também acontecerá, englobando os processos de síntese dos capsídeos da progênie viral, o preenchimento dos capsídeos com o material genético e a aquisição de fibrilas (KUZNETSOV *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2017). A síntese proteica, em parte no retículo endoplasmático, é importante para dar origem à matéria prima para a confecção dos capsídeos, que migra para o interior das fábricas virais (MUTSAFI *et al.*, 2013).

Membranas celulares com estruturas lamelares provenientes do retículo endoplasmático, que também são chamadas de crescentes virais, vão mudando de forma e espessura conforme migram do interior das FVs para a periferia e originam os capsídeos com formato icosaédrico. Na área de aquisição de fibrilas, localizada na periferia das FVs, os capsídeos ganham fibrilas ao mesmo tempo em que ocorre o preenchimento das partículas com o genoma e outras moléculas que os vírions carregam através do portal localizado do lado oposto do *stargate* (ANDRADE *et al.*, 2017; ZAUBERMAN *et al.*, 2008).

A fábrica viral preenche quase todo o citoplasma celular e a célula é tomada por novas partículas recém-sintetizadas ao fim do ciclo. Estas novas partículas são então liberadas, finalmente, por lise celular para serem então capazes de iniciar uma nova infecção em outras células (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007).

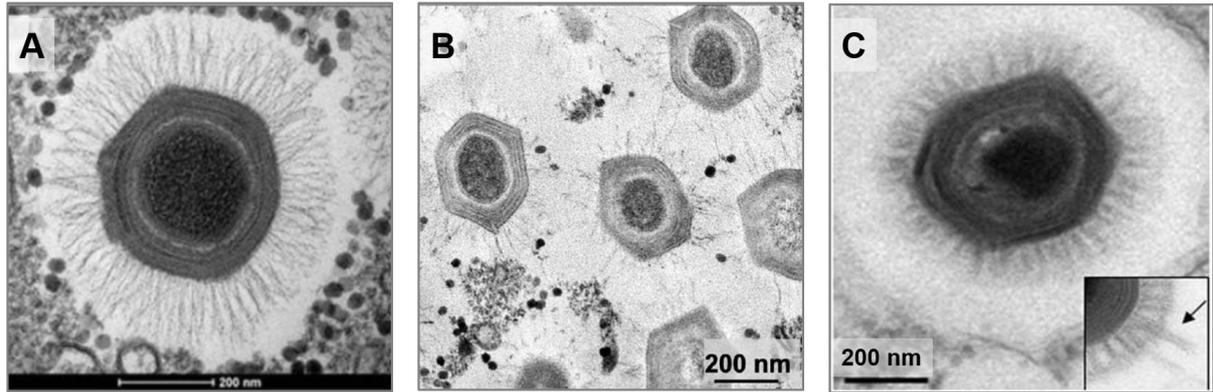


**Figura 7 - Ciclo de multiplicação de um mimivírus.** As partículas penetram na célula hospedeira por fagocitose e logo após, o lisossomo e o fagossomo, onde o vírus se encontra, se fundem. Com a fusão ocorre a abertura do stargate seguida pela liberação da semente viral. Uma fábrica viral precoce é estabelecida e as proteínas virais são sintetizadas fora da fábrica. Não se sabe ao certo qual é e se existe um papel do núcleo da célula na replicação do genoma do mimivírus. Crescentes virais, que se originam do recrutamento de membranas que migram do retículo endoplasmático em direção ao interior da fábrica viral madura, aumentam em espessura e complexidade e podem adquirir material genômico e fibrilas concomitantemente. As partículas se movem do núcleo da fábrica viral para a área de aquisição de fibrilas (AAF), onde as partículas recebem as fibrilas. Dentre as novas partículas virais formadas, algumas delas podem não ser infecciosas (partículas defectivas), apresentando morfologia atípica. A progênie viral é liberada por lise celular. **Fonte:** Adaptado de ANDRADE *et al.*, 2017.

### 1.5.3 Filogenia

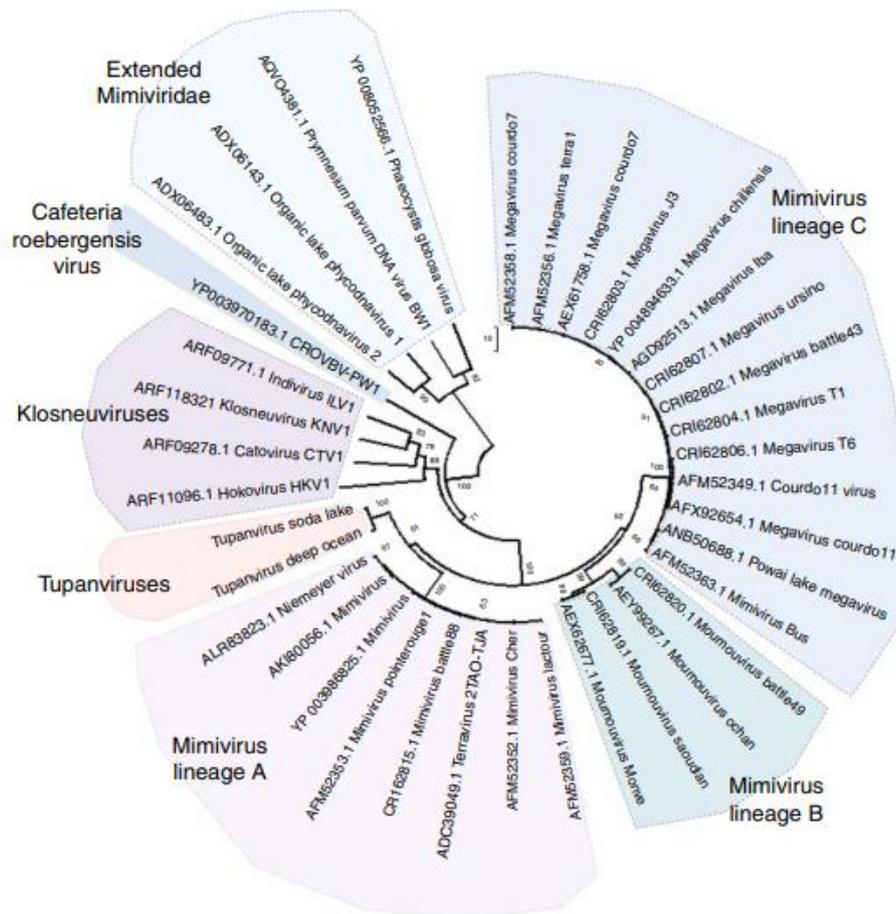
A classificação taxonômica dos vírus gigantes como um todo é um terreno da virologia em constante debate. Até porque, por se tratarem de vírus descritos a menos de duas décadas, estão sempre recebendo novos exemplares que expandem este grupo e novas informações acerca de sua biologia, filogenia e genômica, o que consiste em um desafio para a classificação. Dessa forma, várias famílias hipotéticas foram sugeridas ao longo dos anos com o aumento da diversidade de novos isolados. Recentemente, muitos destes vírus passaram por uma reclassificação pelo órgão responsável, o ICTV, como mencionado anteriormente, e os mimivírus são um deles.

Atualmente, os mimivírus pertencem à família *Mimiviridae*, à ordem *Imitervirales*, à classe *Megaviricetes* e ao filo *Nucleocytoviricota* (KOONIN et al., 2020). Dentro desta família apenas dois gêneros são reconhecidos oficialmente, *Cafeteriavirus* e *Mimivirus*, compostos apenas por uma espécie cada, *Cafeteria roenbergensis* vírus e *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, respectivamente (ICTV ONLINE, 2020). Apesar disso, muitos isolados de mimivírus já foram descritos e análises filogenéticas iniciais levaram à formação de três clados distintos, conhecidos como linhagens A, B e C (COLSON et al., 2012). A linhagem A é representada pelo APMV e vírus similares a ele, como o isolado brasileiro sambavírus. A linhagem B consiste nos moomouvírus e seus relacionados e a linhagem C é composta pelos megavírus e outros vírus similares. (YOOSUF et al., 2012; ARSLAN et al., 2011). Estudos anteriores mostraram uma predominância de mimivírus da linhagem A no Brasil, quando isolamentos feitos utilizando amebas pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba* e *Vermamoeba*, resultaram em sua maioria em novos isolados pertencentes a essa linhagem (DORNAS et al., 2015 e ANDRADE et al., 2018). Essa predominância é seguida pelos isolados de linhagem C e por último, os mimivírus que pertencem à linhagem B (DORNAS et al., 2015). Além das características moleculares, é possível observar diferenças na morfologia das fibrilas de cada um desses vírus de acordo com a linhagem à qual estão relacionados (Fig. 8), porém até o presente estudo este aspecto das fibrilas ainda não havia sido explorado e estudado mais a fundo. Arslan e colaboradores (2011) mostraram no trabalho de isolamento do megavírus chilensis que suas fibrilas são diferentes quando comparadas às do APMV, porém não se aprofundaram no assunto.



**Figura 8** – As diferentes aparências das fibrilas de mimivírus pertencentes às linhagens A, B e C. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de partículas virais de três mimivírus diferentes. (A) Partícula do APMV, vírus relacionado à linhagem A de mimivírus, que possui muitas fibrilas longas recobrando o capsídeo viral. (B) Partículas virais do Borely mounouvírus, um representante da linhagem B, que apresenta um número muito menor de fibrilas longas recobrando seu capsídeo. (C) Partícula de um megavírus chilensis onde é possível notar que as fibrilas se dispõem ao longo da partícula de forma mais aproximada umas das outras, formando “tufos”. O quadro à direita da imagem destaca um detalhe peculiar das fibrilas destes vírus, onde a seta aponta para dois “tufos” de fibrilas mais longas. **Fonte:** Modificado de ARSLAN *et al.*, 2011; ABRAHÃO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020.

Outras linhagens também vêm sendo identificadas e propostas de acordo com o crescente isolamento de novos vírus pertencentes à família *Mimiviridae* (Fig. 9). Rodrigues e colaboradores (2018b), por exemplo, propuseram um novo gênero para agrupar os tupanvírus e uma subdivisão da família *Mimiviridae* também já foi proposta (CLAVERIE; ABERGEL, 2018). Esta subdivisão da família começou a ser explorada principalmente após estudos metagenômicos, que detectaram várias novas sequências de vírus relacionados aos mimivírus, contribuindo para a expansão da família. Como exemplo, podemos citar os klosneuvírus, que foram detectados por metagenômica e que apresentam um aparato de tradução complexo e comparável ao dos tupanvírus (SCHULZ *et al.*, 2017). Um outro exemplo, são as sequências de vírus de alga detectadas também por metagenômica e que geraram a proposta de um novo clado de *Mimiviridae*, nomeado “*extended-Mimiviridae*”, após análises detectarem genes homólogos com mimivírus (YUTIN *et al.*, 2013). Assim, é possível notarmos o quanto esta família é diversa e como sua expansão é algo atual e que provavelmente seguirá crescendo com os constantes isolamentos e atualizações sobre estes novos isolados.



**Figura 9 – Clados da família Mimiviridae.** Árvore filogenética feita com base na sequência que codifica a enzima DNA polimerase B, mostrando as sete subdivisões propostas da família Mimiviridae. **Fonte:** Modificado de ABRAHÃO *et al.*, 2018, p.4.

#### 1.5.4 Genoma

O primeiro mimivírus isolado, o APMV, apresenta um genoma composto por uma molécula linear de DNA fita dupla, com um comprimento de 1.181.549 pb, sendo rico em Adenina-Timina (A-T) que representam 72% dessas bases e Guanina-Citosina (G-C) correspondem aos 28% restantes do conteúdo de bases (RAOULT *et al.*, 2004; LEGENDRE *et al.*, 2011). Estudos genômicos mostraram que o genoma desse vírus apresenta uma densidade de codificação de 89%, 1.018 possíveis fases abertas de leitura (ORFs - *open reading frames*), 979 sequências codificadoras de proteínas e sequências preditas para codificar 6 RNAs transportadores, além de vários RNAs não codificantes. (LEGENDRE *et al.*, 2011). Além disso, é importante ressaltar que estes vírus também possuem genes considerados inéditos dentre a maior parte dos vírus, como aqueles capazes de codificar fatores de tradução, RNA transportadores e aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) que codificam proteínas funcionais

(ABERGEL *et al.*, 2007; LEGENDRE *et al.*, 2010; LEGENDRE *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Íntrons e inteínas foram detectados em genes que codificam a proteína principal do capsídeo e dentre outros genes conservados, além de um mobiloma exclusivo do APMV (DESNUES *et al.*, 2012).

Dentro do repertório genômico dos mimivírus encontramos homologias com genes tanto de outros vírus, quanto de bactérias, arqueias e eucariotos (ABERGEL; LEGENDRE; CLAVERIE, 2015). Os genes que apresentam homologia com outros vírus destacam-se por serem conservados dentre o grupo dos NCLDV e estão associados às funções de replicação e transcrição de DNA e morfogênese de partículas virais. Dentre estes, podemos citar a DNA polimerase B, a helicase D5, a ATPase A32L, a proteína principal do capsídeo e um fator de transcrição (IYER; ARAVIND; KOONIN, 2001; RAOULT *et al.*, 2004; YUTIN *et al.*, 2009).

Já sobre os genes pertencentes a organismo não-virais com os quais o APMV apresenta homologia, foi observada uma variedade de sequências com funcionalidades bem diversas (KOONIN, 2005). Esses genes foram organizados em 4 conjuntos diferentes de acordo com a sua função: tradução de proteínas, enzimas de reparo do DNA, chaperonas e novas vias enzimáticas (RAOULT *et al.*, 2004). Dentre esses, o conjunto que mais chamou a atenção dos pesquisadores foi o de tradução de proteínas, por se tratarem de genes inéditos dentre os vírus até então.

Em relação ao conjunto de genes envolvidos na tradução de proteínas, os mimivírus pertencentes a linhagem A possuem 4 tipos de aaRS (Arginil-tRNA sintetase [ArgRS]; Cisteinil-tRNA sintetase [CysRS]; Metionil-tRNA sintetase [MetRS] e Tirosil-rRNA sintetase [TyrRS]), 5 fatores de tradução (IF4, IF4E, SUI1, eF-TU, eRF1) e 4 tipos de RNAt (leucina, histidina, cisteína e triptofano), sendo que o RNAt da leucina apresenta 3 duplicações, totalizando 6 sequências codificadoras de RNAt (RAOULT *et al.*; ABRAHÃO *et al.*, 2017). A quantidade destes genes pode variar dentro da família *Mimiviridae*, e até dentre os isolados pertencentes a uma mesma linhagem, pois mutações acabam levando a deleções ou duplicações de algum gene e alterando assim o número encontrado em cada um.

Enzimas de reparo de DNA, que apresentam homologia com genes presentes em bactérias e arqueias, são encontradas nestes vírus (SUZAN-MONTI; LA SCOLA; RAOULT, 2006). Dentre essas enzimas, encontramos topoisomerases de três tipos (I A, II A e IB) coexistentes, algo raro em microrganismos, e a topoisomerase do tipo I A foi descrita pela primeira vez para vírus no APMV (RAOULT *et al.*, 2004). Além dessas, outras 4 enzimas foram descritas pela primeira vez em vírus que apresentam genoma composto por DNA fita dupla: DNA glicosilases, que atuam na localização e excisão de pirimidinas oxidadas

(BANDARU *et al.*, 2007); uma endonuclease associada ao dano causado por radiação ultravioleta; uma proteína da família MutS, envolvida no reparo de incompatibilidade (*mismatch*) de DNA e a 6-O-metilguanina-DNA-metiltransferase (RAOULT *et al.*, 2004).

Já na categoria das chaperonas, que são enzimas envolvidas no processo de enovelamento do DNA, o APMV foi o primeiro vírus a apresentar homologia com sequências relacionadas a proteínas e enzimas de bactérias *Escherichia coli*: proteína do choque térmico (*heat-shock*) e uma ciclofilina (peptidilprolil isomerase) (RAOULT *et al.*, 2004; THAI *et al.*, 2008; BARIK, 2018).

Por fim, temos também a categoria de enzimas envolvidas em processos metabólicos diversos, como o metabolismo de açúcares, lipídeos e aminoácidos. A asparagina sintase e a glutamina sintase estão envolvidas na via metabólica de aminoácidos (RAOULT *et al.*, 2004), uma enzima homóloga à lanosterol 14-alfademetilase e a primeira proteína da superfamília citocromo P450 descrita em um vírus, participa do metabolismo de lipídeos (LAMB *et al.*, 2009). Já para a via metabólica de açúcares pode-se destacar 6 tipos de glicosiltransferases e a enzima GlmU, que possuem como função a glicosilação de proteínas após a tradução e catalisação da síntese de um metabólito central para a formação de todos os tipos de polissacarídeos, respectivamente (RAOULT *et al.*, 2004; KLOSE *et al.*, 2010).

A ORF L230 dos mimivírus codifica uma proteína homóloga à enzima procolágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenase, e é responsável por modificar colágeno após a tradução, atuando assim na maquinaria de glicosilação dos mimivírus. Essa foi a primeira descrição de uma enzima de glicosilação de colágeno viral e da primeira hidroxilisina não-animal (LUTHER *et al.*, 2011).

O teor protéico dos mimivírus é vasto e engloba diversos tipos de proteínas formadas por múltiplos domínios e repetições. No genoma do APMV encontramos oito genes para proteínas contendo repetições que formam a estrutura de colágeno composta por tripla hélice, o que só era observado anteriormente em bacteriófagos (RAOULT *et al.*, 2004, LUTHER *et al.*, 2011). Porém, o papel das proteínas de colágeno nos mimivírus ainda precisa de estudos para um maior entendimento, apesar de ser relacionado em alguns estudos à superfície das partículas virais (RAOULT *et al.*, 2004; SHAH *et al.*, 2014). Além das proteínas de colágeno, as repetições Kelch; MORN (*membrane occupation, and recognition nexus*); a repetição rica em leucina (LRR- *leucine-rich repeat*), repetição do tetratricopeptídeo (TPR); repetição de fenilalanina-asparagina-isoleucina-prolina (FNIP/IP22); repetição triptofano-ácido aspártico (WD40); a repetição de anquirina (ANK) e a repetição Sel 1 também são encontradas no proteoma dos mimivírus. Estas já tiveram sua presença correlacionada com o tamanho do

genoma dos vírus gigantes de forma proporcional, ou seja, quanto maior o genoma, maior a quantidade de proteínas contendo essas estruturas (SHUKLA *et al.*, 2018).

Por fim, é preciso destacar que apesar do grande e diverso repertório genômico dos mimivírus, a maior parte dele é composta por genes ORFans, para os quais não encontramos homologias para a predição de possíveis funções nos bancos de dados. Muitos esforços têm sido feitos atualmente para elucidar as funções destes genes utilizando metodologias diversas, o que pode nos levar futuramente a não só compreender estas funções, mas também a conhecer novas dentre a virosfera (SAINI *et al.*, 2007; HAKIM *et al.*, 2012; SOBHY *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os mimivírus foram os primeiros vírus gigantes de ameba isolados no mundo, logo são os que já foram mais bem estudados dentre eles. Um arsenal de informações sobre esses vírus pode ser encontrado na literatura, porém, por se tratarem de organismos tão peculiares, atualmente muito ainda permanece desconhecido ou não tão bem elucidado. A classificação taxonômica e filogenética, por exemplo, permanece em grande debate e atualização constante. Os mimivírus são classificados pelo ICTV atualmente do nível de Domínio (*realm*) até espécie, pertencendo à família *Mimiviridae*. Essa família se caracteriza por estar em constante expansão, apesar de ainda compreender apenas dois gêneros oficiais. Vários estudos anteriores mostraram análises filogenéticas diversas, feitas a partir de diferentes sequências de genes ou proteínas e que mostram a possível divisão desses vírus em três diferentes linhagens: A, B e C. O GEPVIG já isolou e estudou diversos mimivírus diferentes, e ao longo dos anos, percebeu-se peculiaridades nas fibrilas dos mimivírus das diferentes linhagens. Isso gerou uma grande curiosidade e uma dúvida sobre essa diferença ser observada por se tratar de uma característica intrínseca a esses vírus ou de ser possivelmente um produto obtido através da forma como a preparação para visualização por microscopia eletrônica é feita. Comprovar que essa é uma característica intrínseca das partículas virais de mimivírus evidencia e reforça sua classificação em três linhagens, bem como nos auxilia na identificação de novos isolados e fomenta nosso conhecimento acerca da biologia, ecologia e relações com o hospedeiro. Informações acerca da diversidade de uma família em grande expansão, a família *Mimiviridae*, são de grande importância para a atualização da mesma e do conhecimento acerca de sua biologia, taxonomia, filogenia e evolução, justificando assim a necessidade de novos estudos.

### **3 OBJETIVOS**

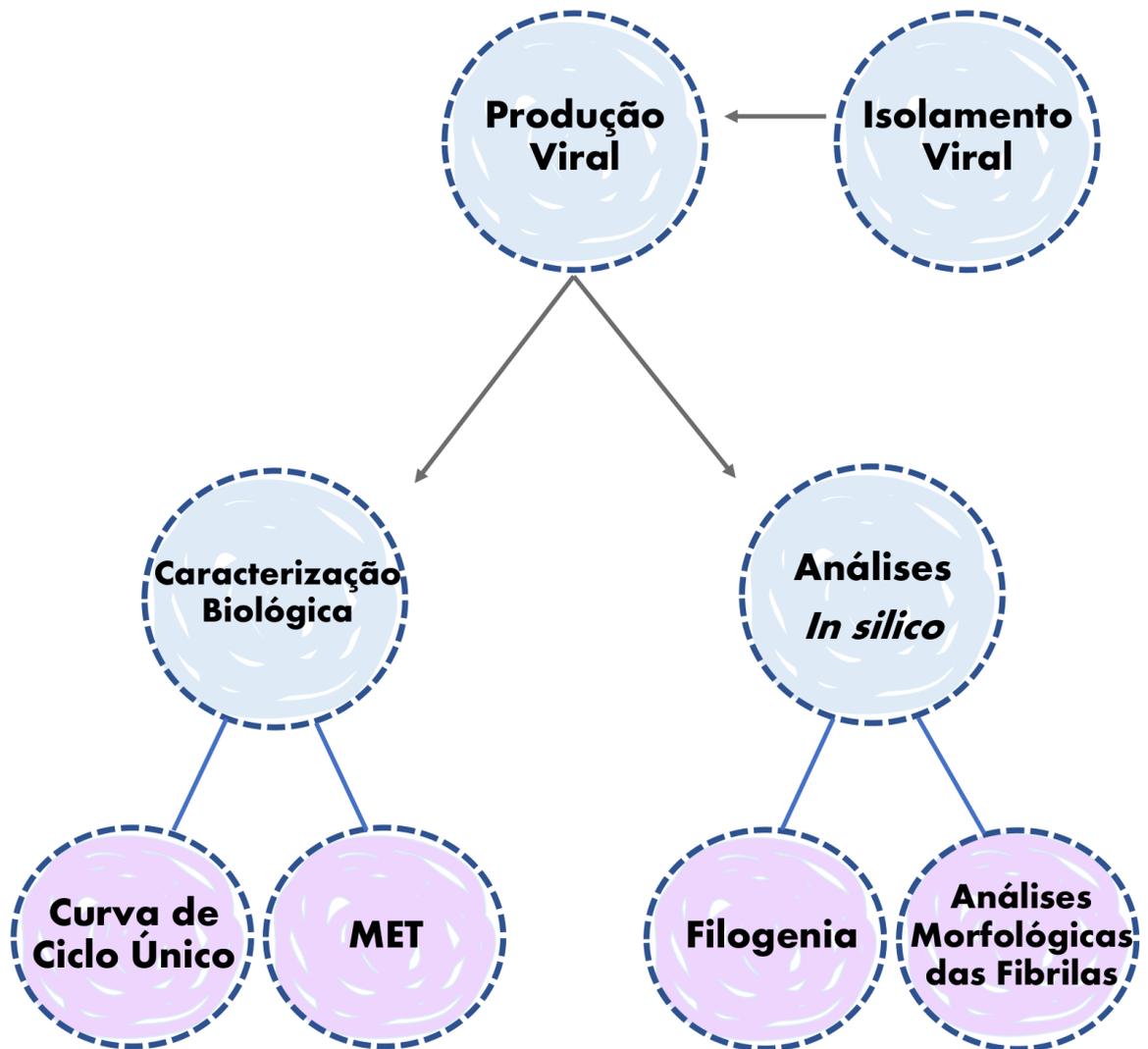
#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar um novo isolado de mimivírus e analisar suas fibrilas no contexto taxonômico relacionado à subdivisão do gênero *Mimivirus* nas linhagens A, B e C, expandindo o conhecimento acerca de um grupo viral diverso.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Descrever e caracterizar um novo isolado de vírus gigante de ameba;
- Estudar o ciclo e perfil de multiplicação do novo isolado;
- Analisar as diferenças morfológicas das fibrilas apresentadas por mimivírus distintos de acordo com as linhagens A, B e C a qual pertençam;
- Analisar a filogenia dos mimivírus com enfoque na separação destes vírus nas linhagens A, B e C;
- Analisar a divisão das linhagens A, B e C de mimivírus sob a ótica da morfologia das fibrilas.

## 4 FLUXOGRAMA



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Cultivo celular

O sistema celular utilizado durante o trabalho foram amebas da espécie *Acanthamoeba castellanii*, originadas da organização estadunidense *American Type Culture Collection* (ATCC 30234), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Amebíases da UFMG e adaptadas às condições de cultivo do Laboratório de Vírus da UFMG (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) - A580BBD). As células são estocadas em forma de cistos, sendo necessário o desencistamento prévio antes da utilização em qualquer ensaio. Para realizar o desencistamento, os cistos em um criotubo foram homogeneizados com o auxílio de um vórtex. Depois, o conteúdo do criotubo foi transferido para o microtubo de 1,5 mL, posteriormente, foi submetido à centrifugação a 900 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de uma micropipeta, o conteúdo foi ressuspenso com meio PYG suplementado com antibióticos utilizados para prospecção e então o conteúdo foi transferido para uma garrafa de cultivo pequena, completando o volume final de 5 mL com meio PYG de prospecção. As garrafas foram incubadas em estufa de amebas a 30°C até que a forma de trofozoíto fosse observada. Os antibióticos utilizados para suplementar o meio PYG de prospecção foram penicilina (500 U /mL - Schering-Plough, Brasil), estreptomimicina (50 mg/mL- Schering-Plough, Brasil), anfotericina B (25 mg/mL - Cristalia, São Paulo, Brasil), vancomicina (0,004 mg/mL - Inlab, Brasil), ciprofloxacina (0,004 mg/mL - Sigma-Aldrich, U.S.A) e doxiciclina (0,020 mg/mL - Sigma-Aldrich, U.S.A).

As amebas já em sua forma ativa, foram cultivadas em garrafas de cultivo celular, contendo meio Peptona-Extrato de levedura-Glicose (PYG - *Peptone-Yeast extract-Glucose*), cujo protocolo de preparo pode ser encontrado no anexo 1 deste trabalho. O meio PYG foi suplementado com um coquetel de antibióticos a fim de evitar possíveis contaminações, sendo eles a penicilina (500 U /mL - Schering-Plough, Brasil), a estreptomimicina (50 mg/mL- Schering-Plough, Brasil) e a anfotericina B (25 mg/mL - Cristalia, São Paulo, Brasil). Foram utilizadas garrafas de diferentes tamanhos para cultivo, de acordo com a quantidade celular necessária para cada experimento. As garrafas de polipropileno pequenas (T25) e médias (T75) (KASVI, Brasil) utilizadas foram acondicionadas em estufa, já as grandes são de vidro (300 cm<sup>2</sup>) e foram acondicionadas em incubadora Roller.

As células foram mantidas realizando-se três subcultivos por semana ou de acordo com a necessidade, sendo o sobrenadante descartado da garrafa primariamente com cuidado para não

prejudicar a aderência das células na garrafa formando a monocamada. Depois, foi adicionado meio PYG suficiente para cobrir o fundo da garrafa onde as células se encontravam aderidas, apenas para auxiliar na sua soltura mecânica da superfície da garrafa de cultura, feita com leves batidas. Após este processo, todo o conteúdo da garrafa foi coletado e o número de células por mL foi estimado, com auxílio de uma câmara de Neubauer (KASVI, Brasil). O líquido foi então dividido em novas garrafas de cultura com a adição de meio PYG fresco, respeitando uma proporção relativa ao tamanho da garrafa utilizada, e a garrafa foi incubada em estufa a 30°C (no caso de garrafas de plástico) ou a 32°C em incubadora *roller* (no caso de garrafas de vidro). As células sub-cultivadas foram utilizadas para os experimentos de isolamento viral, multiplicação e titulação viral, bem como para o preparo de amostras para visualização em microscopia eletrônica de transmissão.

## 5.2 Isolamento viral

Um dos vírus objeto de estudo deste trabalho foi isolado a partir de amostras de água obtidas em corpos d'água em Belo Horizonte, Minas Gerais, entre 2012 e 2019 (SISGEN A702EB8 e ABF23CC). As coletas foram feitas em tubos Falcon de 50 mL estéreis, e posteriormente aliqüotadas em microtubos de 1,5 mL. Após a coleta, a amostra foi submetida ao método de prospecção por inoculação direta, no qual 100 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) da amostra coletada pura e diluída em PBS foram inoculados em poços de placas de 96 poços, contendo  $4 \times 10^4$  amebas por poço e meio PYG de prospecção. Um dos poços foi inoculado apenas com PBS, para servir como controle negativo. As placas foram então incubadas em estufa a 30°C. Os poços foram observados diariamente na busca por efeitos citopáticos (ECP), como o arredondamento e lise das células que indicam a presença de vírus gigantes, e as amostras foram submetidas a três passagens subsequentes (ANDRADE *et al.*, 2018). Quando ECP em algum poço foi notado, seu conteúdo foi coletado e analisado para confirmação da presença de vírus por microscopia eletrônica com contrastação negativa. Uma das amostras prospectadas, a 19.10, apresentou ECP e, portanto, seguiu para as etapas seguintes de confirmação do ECP e identificação do novo isolado. Após identificação, partimos para a produção do vírus para ser utilizado em outros ensaios.

### 5.3 Produção dos estoques virais

#### 5.3.1 Vírus utilizados no trabalho

Vários mimivírus diferentes foram utilizados durante o trabalho, sendo que a maioria deles é fruto de isolamentos feitos pelo GEPVIG, como descrito acima no item 5.2, e fazem parte do nosso banco de isolados (SISGEN A702EB8 e ABF23CC). Os mimivírus APMV, mimivírus PU e mimivírus CAP10 foram utilizados para representar a linhagem A. Para a linhagem B, os representantes escolhidos foram: Borely moomouvírus, moomouvírus 5 e moomouvírus 22. Já para a linhagem C, utilizamos imagens dos megavírus 19.10 (isolado e descrito neste trabalho), megavírus 17b.10 e megavírus 19.2. O APMV foi cedido por colaboradores (Prof. Bernard La Scola, AMU), sendo o único que não fazia parte do nosso banco de isolados. Alguns mimivírus utilizados neste trabalho tiveram seu isolamento descrito em um estudo anterior e foram analisados por PCR em tempo real com a finalidade de relacioná-los às linhagens A, B e C de mimivírus (ANDRADE *et al.*, 2018). No presente trabalho, estes vírus foram nomeados e utilizados para análises de imagem. São eles: mimivírus PU (isolado PU), mimivírus CAP10 (isolado CAP10), moomouvírus 22 (isolado 22), moomouvírus 5 (isolado 5), megavírus 17b.10 (isolado 17b.10) e megavírus 19.2 (isolado 19.2).

#### 5.3.2 Multiplicação e purificação viral

Para os experimentos e análises feitos no trabalho, foi necessário multiplicar e purificar os vírus utilizados. A amostra original do isolamento viral foi utilizada para produzir um estoque de “pool semente” através da inoculação de 30 µl da amostra em garrafas de cultura de célula contendo  $9 \times 10^6$  amebas *A. castellanii* e meio PYG suplementado com antibióticos. Após a observação de lise das amebas que ocorreu cerca de 4 a 5 dias após a inoculação do vírus, o sobrenadante foi coletado. Após a coleta, o líquido foi aliquoteado em microtubos de 1,5 mL e uma parte foi titulada para posterior produção do “pool trabalho”, enquanto a outra foi estocada em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para produzir o pool trabalho do megavírus 19.10, do APMV e do Borely moomovirus, foram utilizadas garrafas de cultura de vidro (300 cm<sup>2</sup>) contendo  $14 \times 10^6$  amebas e meio PYG, totalizando um volume de 35mL. Nas garrafas, o pool semente foi inoculado na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, como sugerido por Abrahão e colaboradores (2014b). As amostras foram incubadas sob lenta rotação a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  em incubadora *Roller*. Após

observação do efeito citopático, o conteúdo de cada garrafa foi coletado em tubos Falcon de 50 mL, e posteriormente, purificado.

Para dar início a etapa de purificação viral, é preciso garantir que os vírus sejam liberados do interior das células infectadas. Para isso, foram realizadas três sessões de congelamento e descongelamento lento dos tubos contendo o sobrenadante coletado do “pool trabalho”, garantido assim a lise celular. Após este processo, todo o material foi filtrado em membranas contendo poros de 1,2  $\mu\text{m}$ , a fim de desprezar os restos celulares. Em seguida, um colchão de 10 mL de solução de sacarose a 22% (p/v) foi adicionado a tubos próprios para ultracentrífuga *Combi Sorvall Rotor AH-629*, e o líquido filtrado foi pipetado cuidadosamente sobre esse colchão. Os tubos foram balanceados com auxílio de uma balança de precisão e submetidos à ultracentrifugação a 14.000 rotações por minuto (rpm), a temperatura entre 4°C e 8°C por 30 minutos. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante dos tubos foi descartado com cuidado e o *pellet* do primeiro tubo foi ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato salina (PBS) 1x. Do primeiro tubo, a suspensão de PBS + vírus foi passada para o segundo, ressuspensionando os *pellets* de cada tubo sucessivamente. Uma parte das alíquotas foi enviada para o sequenciamento do genoma utilizando a plataforma *Illumina MiSeq* na Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), localizada em Botucatu, São Paulo, sob os cuidados do professor João Pessoa.

A etapa de purificação do “pool trabalho” do isolado viral foi realizada em duas rodadas durante o trabalho. Uma delas passou por uma segunda filtração, ultracentrifugação e foi aliquotada em criotubo de 1 mL para ser enviada para o sequenciamento. Já a outra foi dividida em alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  armazenadas em microtubos de 0,2 mL e posteriormente foram acondicionadas em freezer a -20°C. Essas alíquotas seguiram para titulação e foram utilizadas em diversos experimentos. Para o APMV e Borely, apenas o pool trabalho foi gerado, já que o “pool semente” destes vírus faz parte do banco de isolados virais do GEPVIG após serem gentilmente cedidos por colaboradores. Após a produção, eles foram purificados e aliquotados como descrito acima para posterior titulação e utilização.

### 5.3.3 Titulação viral

Os títulos virais foram obtidos utilizando o método *50% Tissue culture infective dose* (TCID<sub>50</sub>) e calculado conforme descrito por Reed e Muench (1938). Para isso, cada poço de placas de 96 poços foi preenchido por uma solução contendo de aproximadamente 40.000 amebas + meio PYG em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ /poço. Cada coluna da placa (8

poços/replicatas) foi então inoculada com 100 µL de uma diluição diferente do vírus feita na razão de 10 ( $10^{-2}$  a  $10^{-12}$ ) e em meio PBS 1x. Como controle de viabilidade de amebas, uma coluna foi reservada e inoculada com 100 µL de PBS. As placas foram incubadas a 30°C completamente vedadas e cada poço foi monitorado diariamente, para observação de efeito citopático. Após 4 dias de incubação, o cálculo do título viral foi feito conforme os cálculos propostos por Reed e Muench (1938), que consideram a quantidade de vírus necessária para causar efeito citopático em 50% das células inoculadas com o vírus. Os resultados foram expressos em TCID<sub>50</sub>/mL.

#### 5.4 Caracterização morfológica do isolado e de seu ciclo

##### 5.4.1 *Microscopia eletrônica de transmissão*

Para caracterizar morfológicamente o isolado, megavírus 19.10, e observar seu ciclo de multiplicação foi feita a preparação das amostras para visualização por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tal, uma garrafa contendo  $7 \times 10^6$  células em 25 mL de meio PYG foi inoculada com uma amostra do vírus purificado em M.O.I de 0,01 e foi observada diariamente para avaliação do efeito citopático. Essa MOI foi utilizada para permitir a observação do ciclo de multiplicação do vírus de forma assíncrona, uma vez que a baixa quantidade de partículas inoculadas por célula faz com que as células sejam infectadas em momentos diferentes e assim exiba diferentes etapas do ciclo.

Após a observação de efeito citopático, o próximo passo foi desprender a monocamada de células mecanicamente e coletar o conteúdo da garrafa em tubos de 50 mL, que foram centrifugados em centrífuga refrigerada *Sorvall RT6000B* a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuscitado em 5 mL de solução de tampão fosfato de sódio a 0,1 M duas vezes. O sobrenadante resultante foi novamente descartado e o *pellet* ressuscitado, dessa vez utilizando a solução fixadora, produzida a partir de tampão fosfato de sódio 0,1 M e glutaraldeído a 2,5% (p/v). A amostra foi incubada por duas horas, sob temperatura ambiente e rotação, e após esse tempo foi submetida a uma nova centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, na mesma centrífuga. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuscitado novamente na solução tampão fosfato 0,1M. Por fim, o conteúdo foi aliquoteado em um microtubo de 1,5mL, e submetido a centrifugação em centrífuga *eppendorf 5415R* a 3000 rpm por 10 minutos e depois armazenado em geladeira (4°C). O material foi entregue ao CM-UFGM, onde deu-se continuidade às preparações posteriores, dentre as quais incluem a fixação secundária, desidratação, inclusão em resina, ultramicrotomia e contrastação. Quando

pronta para visualização, a amostra foi observada no CM-UFGM, com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12- SpiritBiotwin FEI - 120 kV.

#### 5.4.2 Curva de Ciclo Único

Uma curva de ciclo único foi realizada para avaliar e caracterizar o perfil de multiplicação do mimivírus isolado. Para esse ensaio, duas garrafas pequenas (duplicata) foram preparadas contendo  $1 \times 10^6$  células e meio PYG em um volume final de 5 mL para cada tempo pós-infecção a ser analisado (0, 2, 4, 6 e 12 hpi). O meio contido no sobrenadante das garrafas foi vertido cuidadosamente para evitar a soltura da monocamada celular, e posteriormente foi inoculada 1 mL de uma solução contendo meio PYG e vírus purificados em uma MOI de 10 em cada uma das garrafas. Estas foram então incubadas em estufa a 30°C durante 30 min para adsorção, sendo levemente movimentadas a cada 10 minutos para que o líquido cobrisse toda a monocamada. Após decorrido o tempo de adsorção, o meio foi retirado e a monocamada foi lavada 2 vezes com PBS 1x delicadamente. Ao término das lavagens, 5 mL de meio PYG foram adicionados em cada garrafa e as duas garrafas que representavam o tempo 0 (30 min pós-infecção) tiveram seu conteúdo solto mecanicamente, coletado em tubos Falcon de 15 mL e congelado em freezer a -20 °C. Seguiu-se então a contagem, coleta e congelamento dos tempos subsequentes. O conteúdo dos Falcons foi posteriormente descongelado e seguiu para titulação em duplicata, conforme item 5.1.3. Após a titulação, o *software* GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc., EUA) foi utilizado para plotar o gráfico da curva de ciclo único, que reflete o perfil de multiplicação do vírus.

#### 5.5 Análises comparativas da morfologia das fibrilas de mimivírus

Para comparar a morfologia das fibrilas dos diferentes mimivírus representantes de cada uma das linhagens (A, B ou C), as imagens de MET obtidas conforme item 5.4.1 foram analisadas. Além de preparar cada vírus em amostras individuais, fizemos combinações diferentes dos representantes dos grupos em uma mesma amostra, para buscar evidências de que a diferença das fibrilas não é causada por artefatos gerados por diferentes preparações. Para tal, organizamos os conjuntos de representantes de cada linhagem em trio (A+B+C) e nessa amostra capturamos imagens dos vírus em trio ou duplas (A+B, A+C e B+C). As amostras foram então analisadas no CM-UFGM e utilizadas para comparar a morfologia das fibrilas.

Para destacar a diferença das fibrilas o programa Paint 3D (Microsoft) foi utilizado. Utilizando as ferramentas de desenho “marcador” ou “aquarela” do programa, com a espessura

de 2 a 4 pixels, as fibrilas foram marcadas individualmente e manualmente com um zoom mínimo de 150%. Para cada vírus uma cor específica foi utilizada com opacidade máxima de 35%, verde para mimi A, azul para mimi B e vermelho para mimi C.

## 5.6 Análise filogenética

### 5.6.1 *Obtenção de gene alvo: sequenciamento, montagem e predição de genoma*

As amostras contendo o vírus purificado foram enviadas para o sequenciamento do genoma utilizando na Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), localizada em Botucatu, São Paulo, sob os cuidados do professor João Pessoa. Foi utilizada a plataforma de sequenciamento *Illumina MiSeq*, com bibliotecas de fragmentos do tipo *paired end*. O controle de qualidade das leituras (*reads*) obtidas após o sequenciamento foi feito utilizando o software *FastQC*.

A montagem *de novo* das *reads* obtidas foi feita por meio do programa *Spades 3.12*, utilizando os seus parâmetros padrão (BANKEVICH et al., 2012; PRJIBELSKI et al., 2020). O *scaffolds* resultantes dessa montagem foram comparados com sequências de banco de dados, através do *BLASTn* (banco de dados: nr/nt; *Expect threshold*:  $10^{-3}$ ), otimizado para buscar sequências altamente similares (megablast). Em seguida, a sequência indicada como o *best hit* para os *scaffolds* foi utilizada como sequência de referência para finalizar a montagem do genoma do vírus gigante, que foi realizada utilizando o software *MeDuSa* online (BOSI et al., 2015). As sequências obtidas foram, posteriormente, submetidas à predição de genes através do software *GeneMarkS* (BESEMER et al., 2005). Os genes preditos foram filtrados, mantendo apenas aqueles que codificavam proteínas com mais de 50 aminoácidos. A anotação do genoma será realizada posteriormente e apenas a sequência da enzima DNA polimerase B foi identificada para ser utilizada na construção de filogenia.

### 5.6.2 *Filogenia*

Análise filogenética dos clados de *Mimiviridae* foi feita com base na sequência de aminoácidos que codifica a DNA polimerase B do megavírus 19.10 e de outros vírus associados à família. Para isso, foi preciso localizar a sequência de aminoácidos que codifica a DNA polimerase B do megavírus 19.10 dentre as ORFs obtidas no item 5.6, por meio de um alinhamento das ORFs com a sequência da DNA polimerase B do Megavirus chilensis utilizando a ferramenta *BLASTp* (*expect threshold*:  $10^{-3}$ ) no *Genbank*.

Para alinhar as sequências, o algoritmo *MUSCLE* (EDGAR et al., 2004) foi utilizado. O melhor modelo evolutivo para o alinhamento foi predito pelo algoritmo *ModelFinder*, através

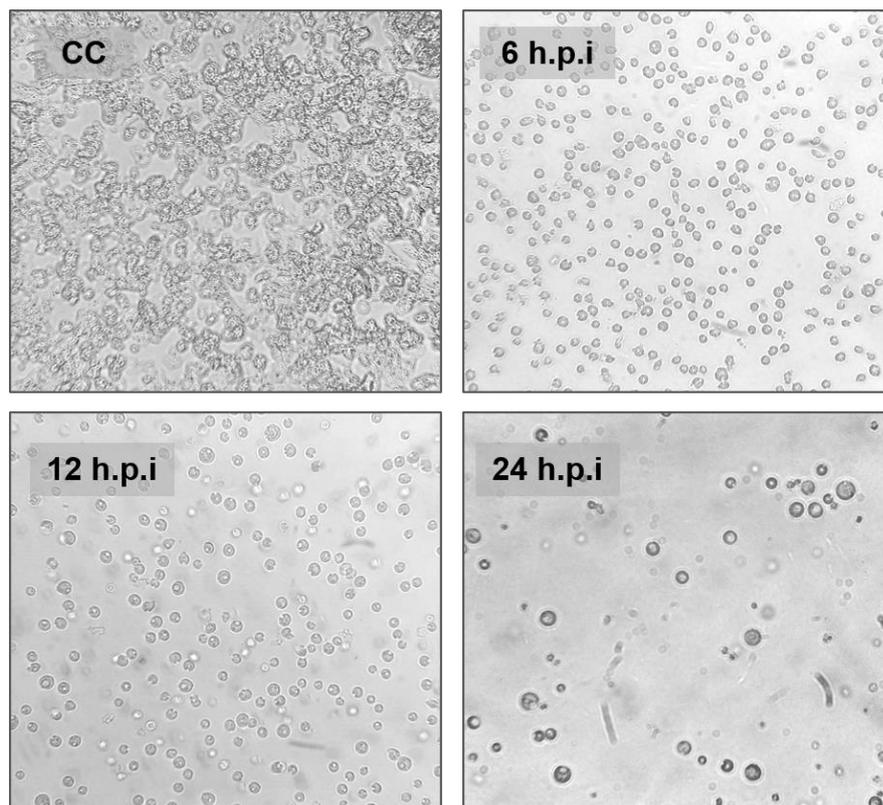
do programa *IQtree*, o qual foi utilizado também para a construção da árvore, pelo método de máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap* (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2014). A árvore construída foi visualizada e editada por meio dos programas *MEGA X* e *iTOL* (KUMAR *et al.*, 2018; LETUNIC *et al.*, 2006).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Isolamento e caracterização morfológica do isolado e de seu ciclo de multiplicação

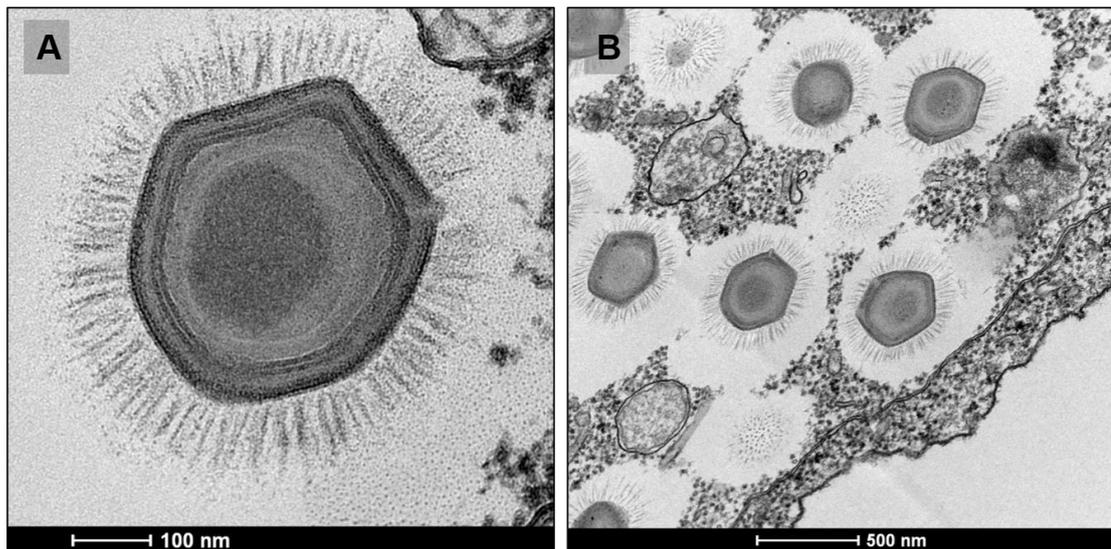
#### 6.1.1 Isolamento e morfologia das partículas virais

A prospecção da amostra 19.10 resultou no isolamento de um novo vírus gigante, tendo como plataforma de isolamento amebas da espécie *Acanthamoeba castellanii*. Ao observarmos o efeito citopático característico de mimivírus no poço da placa contendo esta amostra, seguimos com o procedimento de caracterização de isolados. Utilizando microscopia óptica, fomos capazes de observar a evolução da infecção conforme efeitos citopáticos surgiram e se intensificaram. 6 h.p.i, foi observado que as células começaram a arredondar e a se soltar da monocamada. Com 12 h.p.i, as células já completamente arredondadas começaram a sofrer lise, sendo que em 24 h.p.i foi possível ver que quase todas as células já se encontravam lisadas e restos celulares foram observados no sobrenadante e no fundo das garrafas (Figura 10).



**Figura 10. Efeitos citopáticos em células de amebas *A. castellanii* infectadas com megavírus 19.10.** (CC) indica o controle celular não-infectado, onde é possível observar as células apresentando formato irregular, vacúolos e boa adesão formando uma monocamada, características que nos permitem constatar uma cultura saudável. A partir de 6 horas pós infecção (6 h.p.i) com o megavírus que isolamos, as células já começam a sofrer arredondamento e soltura da monocamada, sendo vistas em abundância no sobrenadante. Após 12 h, foi observado o completo arredondamento e o início da lise celular, que mostra grande progresso após 24 h, onde poucas células ainda são observadas íntegras. As imagens foram obtidas utilizando o aumento de 1000x.

Imagens geradas por MET nos permitiram identificar o vírus isolado como um mimivírus (Figura 11), devido à morfologia característica de suas partículas, compostas por capsídeos apresentando tamanho médio de 435 nm, cobertos por uma camada de fibrilas cuja média de tamanho é de 108 nm. Juntas, as duas estruturas formam partículas de 664 nm em média. Sete partículas virais foram medidas utilizando imagens geradas por MET para calcular as médias de tamanho explicitadas acima. As fibrilas cobrem o capsídeo da partícula, são longas e se agrupam já no ponto de inserção ao capsídeo, formando pequenos grumos. Esta característica dificulta visualizarmos individualmente as fibrilas, uma vez que estas se agrupam desde o ponto de inserção no capsídeo até às porções mais externas. As fibrilas desse vírus se assemelham àquelas observadas para megavírus, por isso o nomeamos de megavírus 19.10, fazendo menção também ao número da amostra da qual este isolado foi obtido.

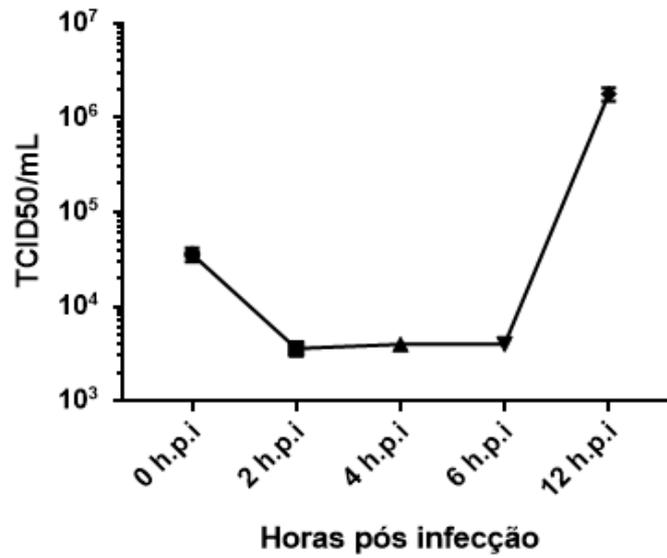


**Figura 11- Partícula do novo isolado, o megavírus 19.10.** (A) Na imagem é possível observar o capsídeo composto por múltiplas camadas envolvendo o genoma, uma região central e mais escura, e coberto por uma camada de fibrilas. (B) Várias partículas maduras do novo isolado dentro do citoplasma da ameba hospedeira ao fim do ciclo de multiplicação.

### 6.1.2 Caracterização do ciclo de multiplicação do megavírus 19.10

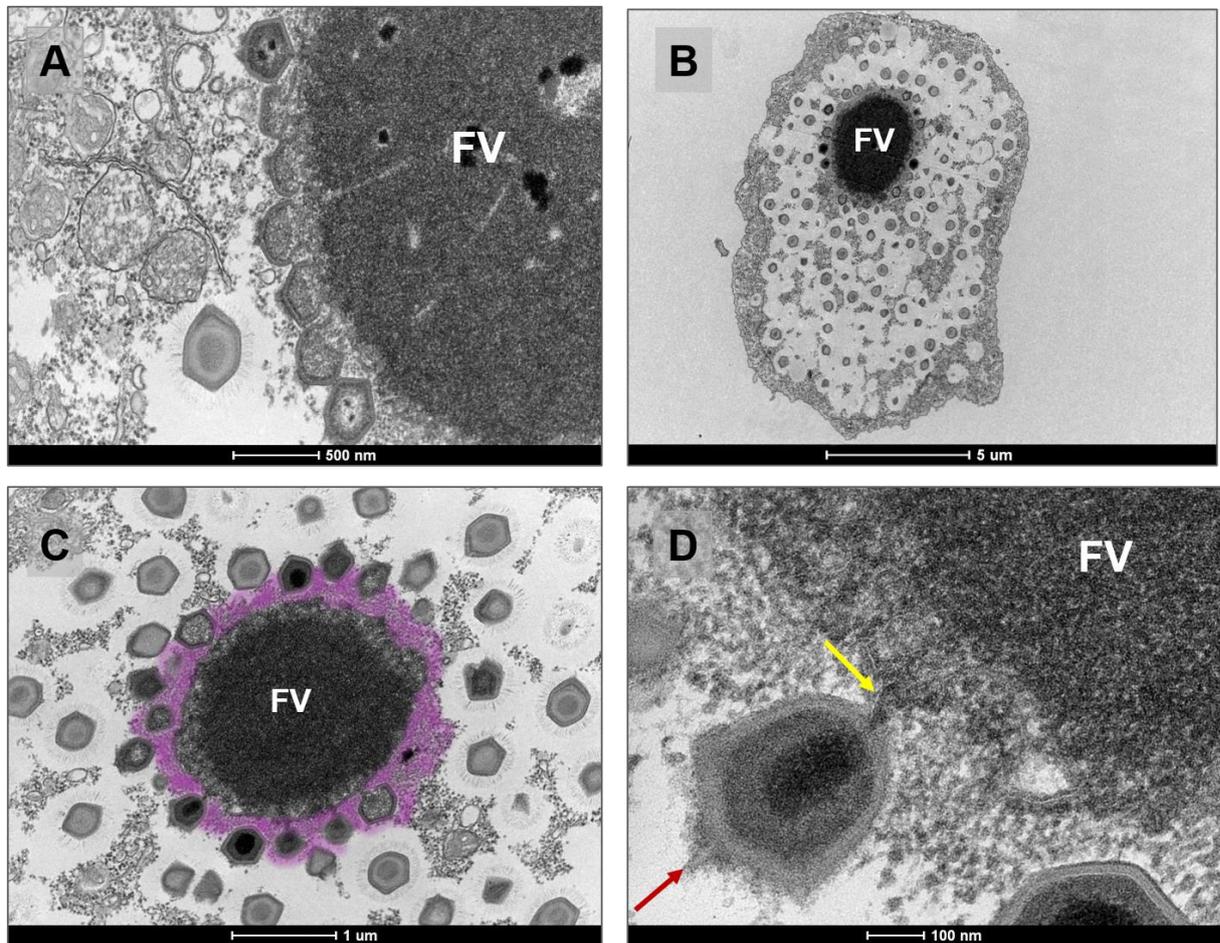
Utilizando o ensaio de curva de ciclo único, buscamos traçar um perfil de multiplicação para o vírus isolado aqui descrito, o megavírus 19.10. No período de 0 a 2 h.p.i, vemos uma queda de aproximadamente 1 log no título viral, indicando o desnudamento do vírus na célula hospedeira. De 4 a 6 h.p.i a curva permanece estável, indicando a fase de eclipse do vírus. A partir de 6 h.p.i inicia-se a produção de novas partículas virais, o que já é esperado e observado

na literatura para outros mimivírus. Neste mesmo período de tempo, observamos por microscopia óptica o arredondamento das células hospedeiras (Fig. 10), causado pela reorganização do citoplasma para dar início à fábrica viral e às novas partículas. Os títulos virais de cada tempo pós-infecção coletado podem ser visualizados no gráfico da Figura 12.



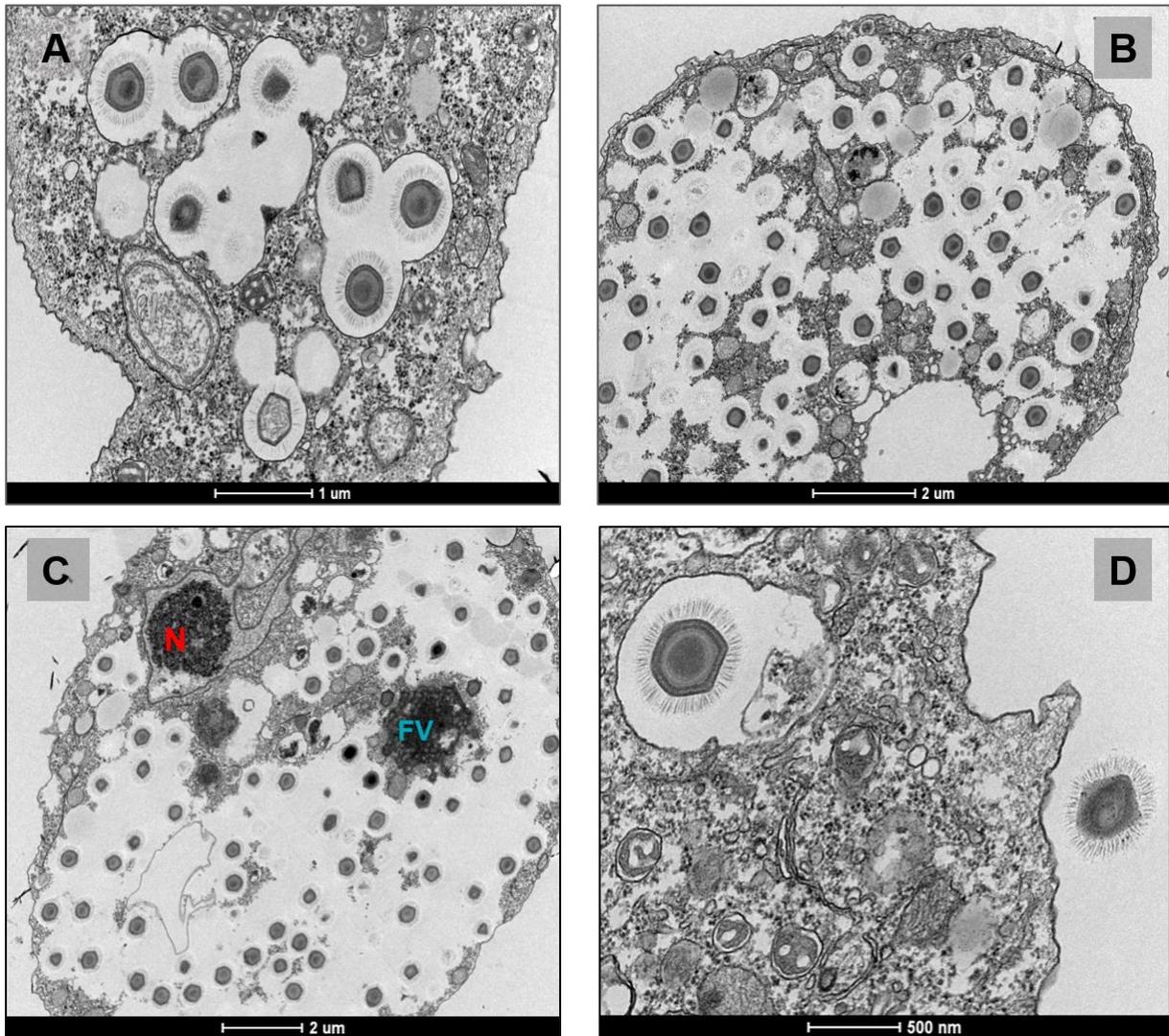
**Figura 12 – Curva de ciclo único do curso da multiplicação do megavírus 19.10.** Os tempos de 0, 2, 4, 6 e 12h.p.i foram utilizados para estudar o perfil multiplicativo do vírus isolado e descrito neste trabalho. O ensaio foi realizado utilizando m.o.i 10. No eixo x, o tempo de coleta das amostras infectadas com o vírus está explicitado. No eixo Y, encontramos os valores relativos ao título para cada amostra coletada em um determinado tempo.

Por meio desse ensaio, a MET também foi utilizada para visualizar o ciclo de multiplicação desses vírus. Com o emprego dessa metodologia fomos capazes de observar que todo o ciclo é similar ao que já foi descrito anteriormente para os mimivírus, o que confirma novamente se tratar de mais um isolado deste grupo. A fábrica viral imatura se formou no citoplasma amebiano após a penetração do vírus por fagocitose, dando início ao ciclo de multiplicação. Após a maturação da fábrica, conseguimos observar muitas mitocôndrias em sua periferia, bem como o início da formação de novas partículas que começam com crescentes virais, que vão aumentando e sendo preenchidas pelo conteúdo presente na fábrica (Fig. 13 A). As fábricas maduras ocupam grande espaço do citoplasma celular (Fig. 13 B), como já descrito anteriormente para outros mimivírus (ANDRADE *et al.*, 2017). Após esse processo, as partículas recebem o conteúdo interno pela extremidade oposta ao *stargate* (Fig. 13 D), ao mesmo tempo que adquirem fibrilas na Área de Aquisição de Fibrilas (Fig. 13 C).



**Figura 13 – Etapas iniciais do ciclo de multiplicação do Megavírus 19.10.** Imagens geradas por MET do ciclo multiplicativo do isolado descrito neste trabalho. **(A)** Formação de novas partículas de mimivírus que se inicia com o preenchimento das crescentes com o material presente na fábrica viral (FV). **(B)** Ameba infectada, em plena produção de novas partículas de megavírus 19.10. É possível observar que a fábrica viral (FV) madura ocupa grande parte do citoplasma hospedeiro. **(C)** Fábrica viral (FV) em produção de novas partículas e a área de aquisição de fibrilas destacada de roxo. **(D)** Detalhes da imagem C, mostrando uma partícula viral do megavírus 19.10 recebendo o conteúdo interno através da extremidade oposta (seta amarela) ao *stargate* (seta vermelha).

As novas partículas se aglomeram no citoplasma hospedeiro, podendo se organizar ou não dentro de vesículas (Fig. 14 A e B), e as fábricas vão diminuindo de tamanho ao longo do curso do ciclo de multiplicação, até se inativarem completamente. Mesmo nesse estágio avançado da morfogênese, é possível observar o núcleo da célula hospedeira com uma organização estrutural ainda complexa, o que não é comum para outros mimivírus na literatura (Fig. 14 C). A liberação se dá por lise e provavelmente também por exocitose (Fig. 14 D).



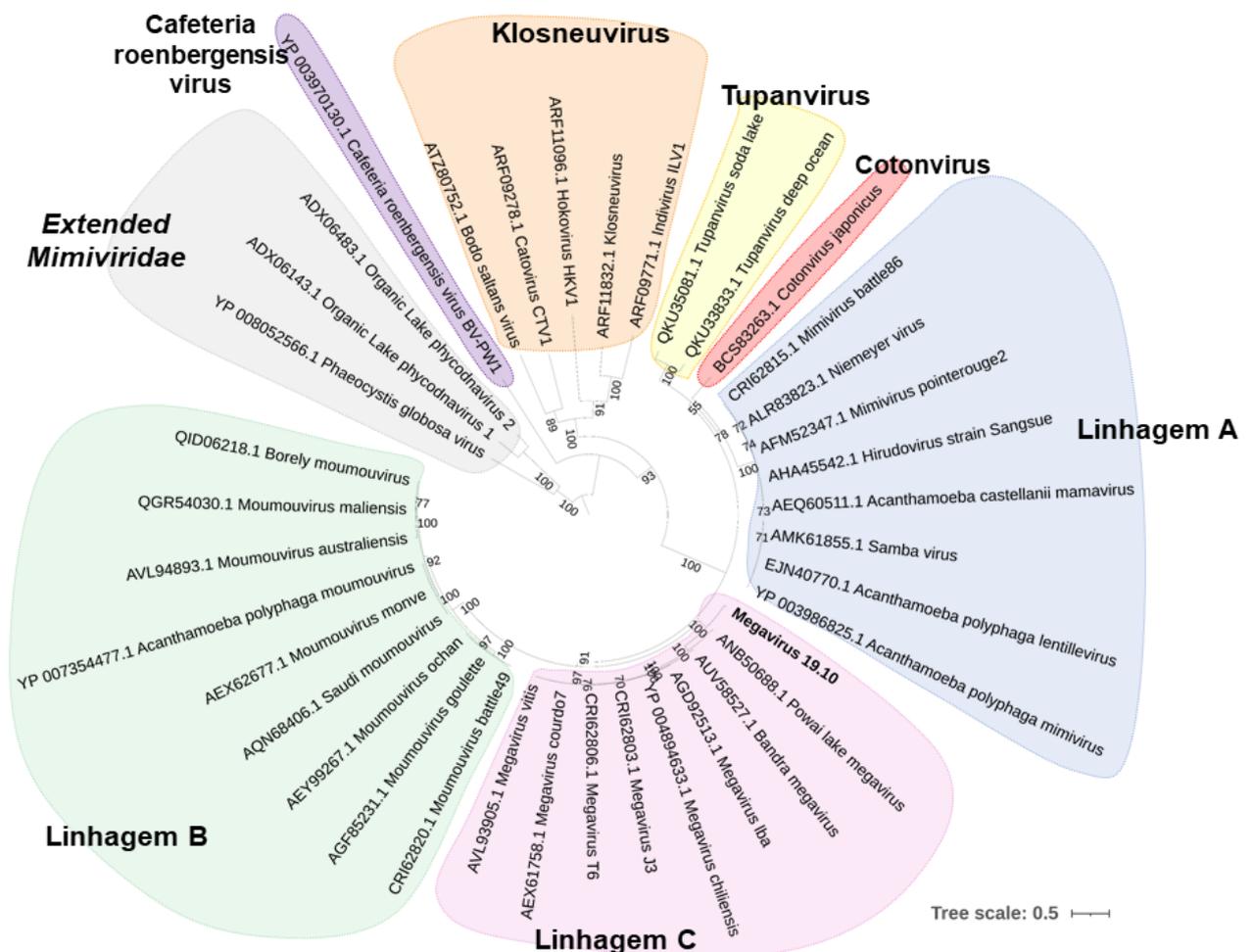
**Figura 14 – Etapas finais do ciclo de multiplicação do megavírus 19.10.** Imagens geradas por MET do ciclo multiplicativo do isolado descrito neste trabalho. (A) Organização de novas partículas do megavírus 19.10 dentro de vesículas no citoplasma celular ou (B) sem a presença de vesículas. (C) Ameba com o citoplasma repleto de novas partículas virais e partículas ainda em produção, onde ainda é possível observar o núcleo (N) estruturalmente complexo e a fábrica viral ainda em atividade (FV). (D) Partícula viral madura dentro de uma vesícula na periferia do citoplasma hospedeiro e próxima a uma outra partícula, já no exterior da célula, sugerindo uma possível liberação por exocitose.

## 6.2 Filogenia

Análise filogenética, feita com base na sequência da enzima DNA polimerase B, indicou que o megavírus 19.10 se relaciona mais proximamente com os mimivírus de linhagem C (Fig. 15). Através da metodologia apresentada no item 5.7 deste trabalho, escolhemos os parâmetros para a construção da filogenia. O melhor modelo para a árvore mais parcimoniosa, selecionado através do IQTree (ModelFinder), foi o VT+F+I+G4. Por meio dessa filogenia, explicitada na árvore da figura 15, conseguimos observar a separação dos vírus utilizados em 8 diferentes

clados. São eles: as linhagens A, B e C, *extended Mimiviridae*, tupanvírus, cotonvírus, klosneuvírus e cafeteria roenbergensis vírus.

Em relação às linhagens de mimivírus, foi observado que dentro da linhagem A, o APMV se agrupa com outros mimivírus que já foram relacionados a essa linhagem em trabalhos anteriores (DESNUES *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2014; BORATTO *et al.*, 2015; ABRAHÃO *et al.*, 2018). Já na linhagem B, o Borely moudouvírus se agrupou com outros moudouvírus, que também já foram relacionados a esta linhagem anteriormente em outros trabalhos (YOOSUF *et al.*, 2012; BAJRAI *et al.*, 2016; ABRAHÃO *et al.*, 2018). Por fim, foi observado que a linhagem C de mimivírus, em nossos resultados, agrupou o megavírus 19.10 junto a outros megavírus, mais uma vez corroborando a literatura (ARSLAN *et al.*, 2011; ABRAHÃO *et al.*, 2018).

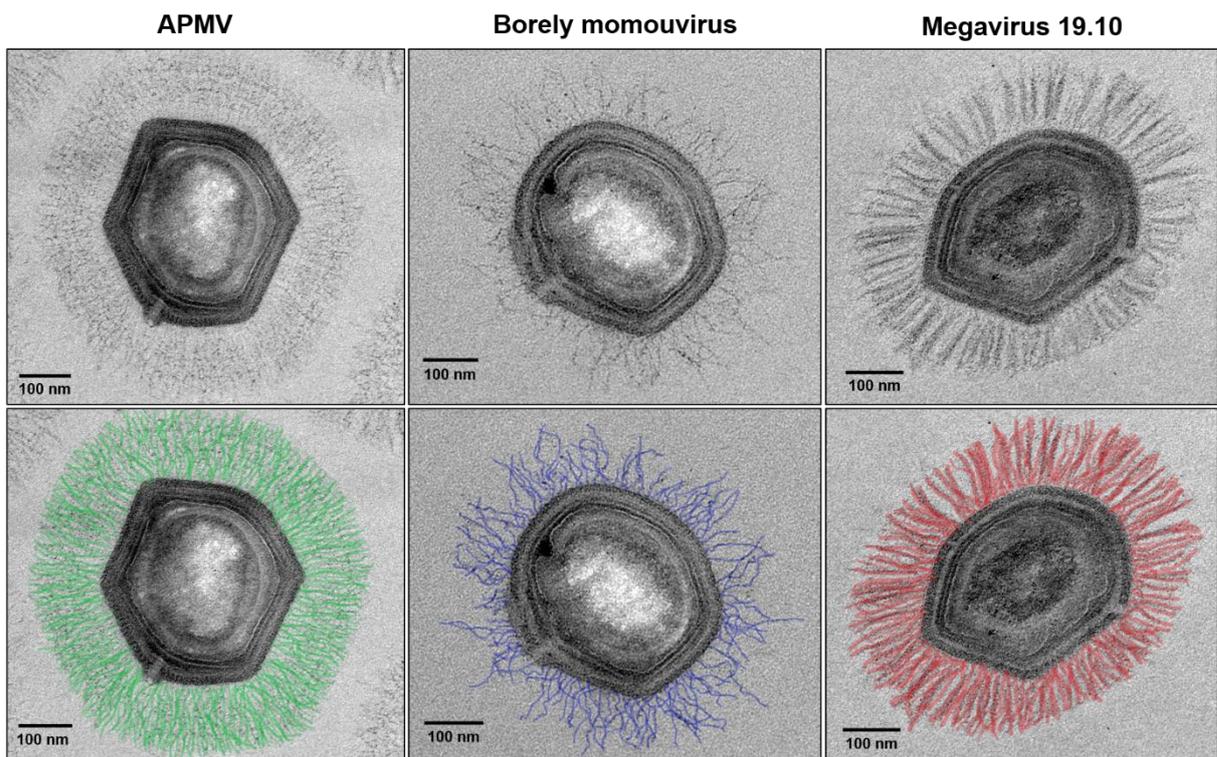


**Figura 15 – Filogenia do megavírus 19.10 e outros vírus relacionados à família Mimiviridae.** Reconstrução filogenética feita com base na sequência de aminoácidos que codifica a enzima DNA polimerase B de diversos

vírus relacionados à *Mimiviridae*, incluindo o isolado descrito neste trabalho, o megavírus 19.10. O novo isolado está destacado em negrito e se encaixou na linhagem C de mimivírus, junto com outros megavírus, como esperávamos.

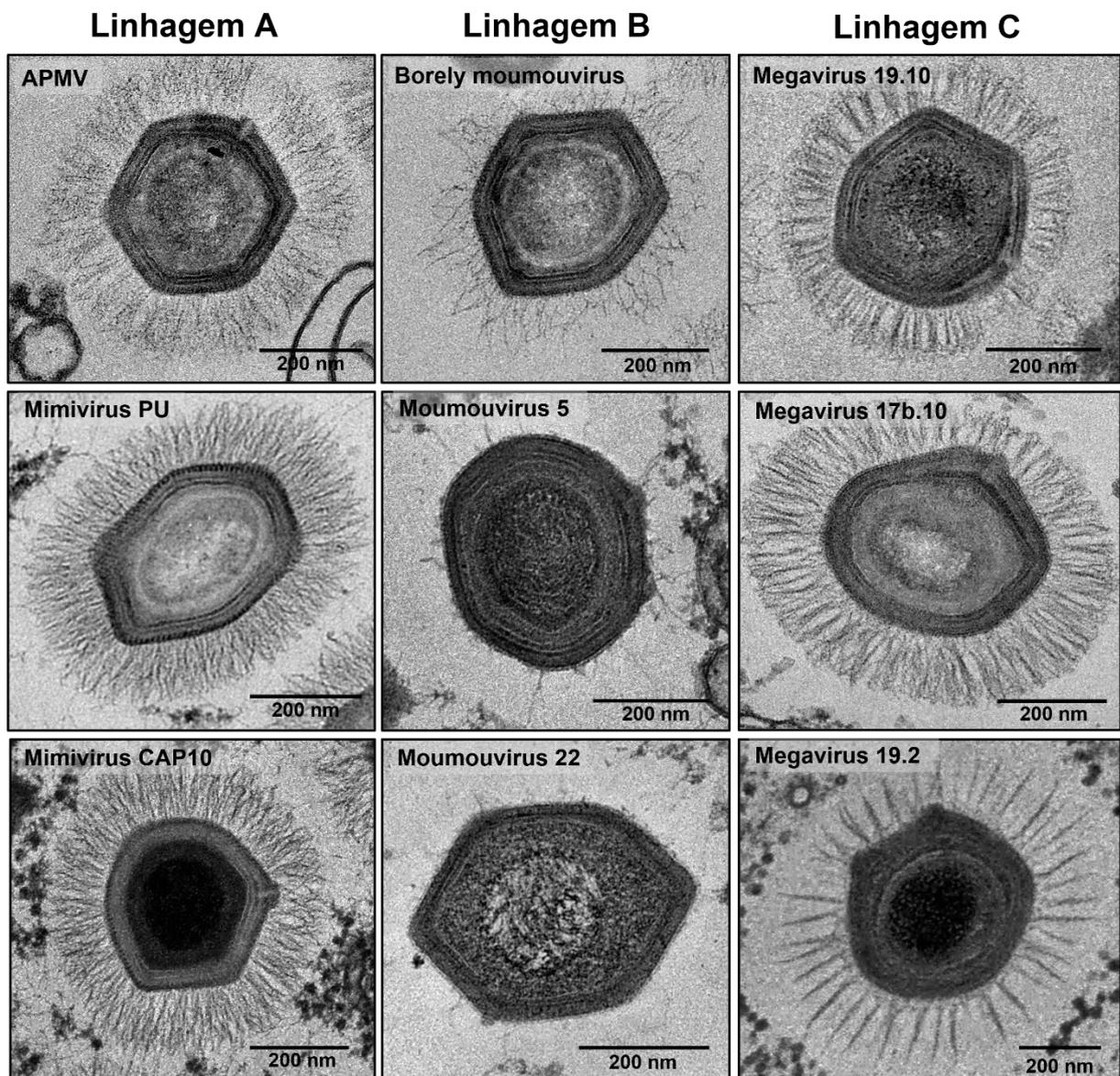
### 6.3 Análises comparativas das fibrilas de mimivírus

Após analisarmos imagens geradas por MET de vários isolados de mimivírus, constatamos que existem diferenças marcantes na morfologia das fibrilas de acordo com a linhagem a qual aquele mimivírus pertence. Nos vírus pertencentes à linhagem A, as fibrilas são encontradas em abundância, cobrindo todo o capsídeo da partícula. Aqueles que pertencem a linhagem B apresentam pouca ou nenhuma fibrila e geralmente quando elas estão presentes, são longas e encontradas mais espalhadas e espaçadas. Finalmente, os mimivírus da linhagem C possuem muitas fibrilas, porém estas se agrupam formando emaranhados. Na figura 16 é possível notar essas peculiaridades.



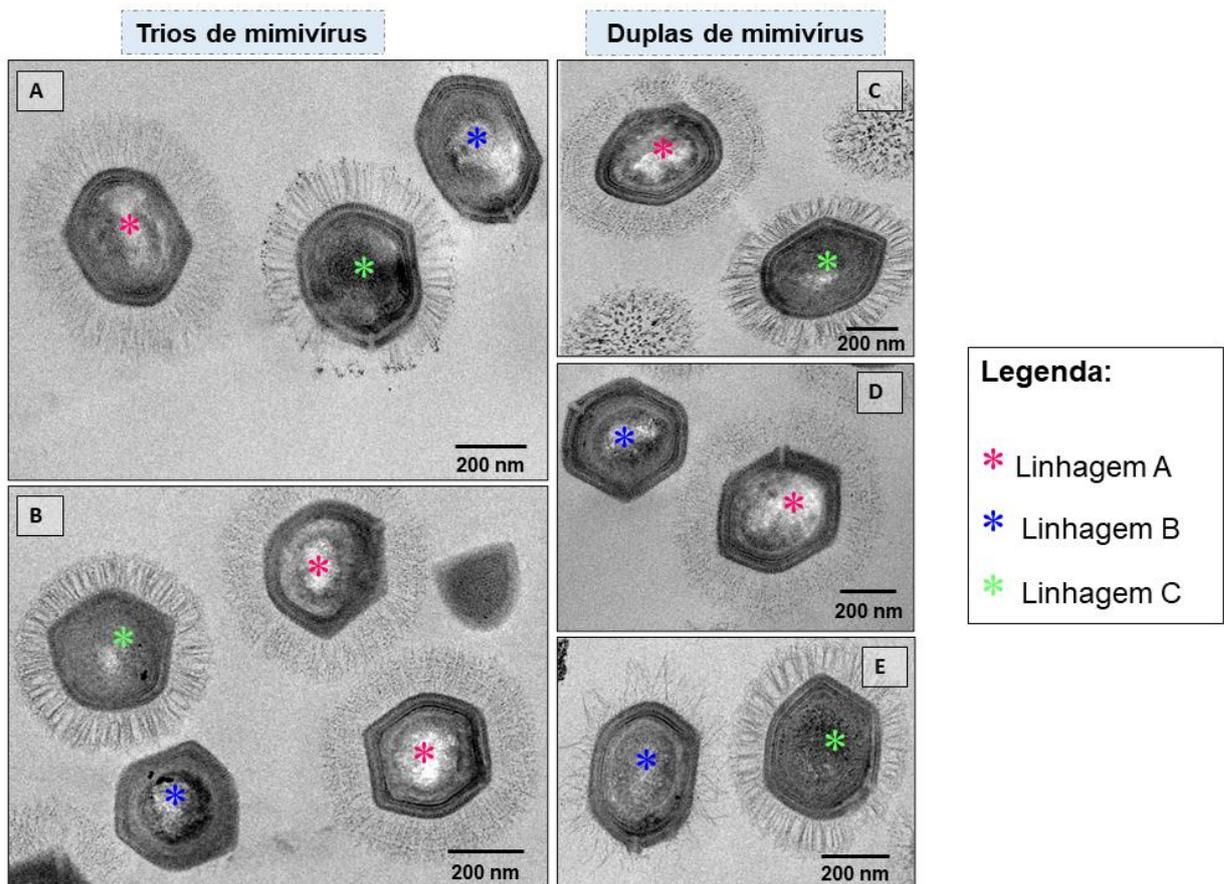
**Figura 16 – Diferenças morfológicas das fibrilas de mimivírus das linhagens A, B e C.** As imagens em escala de cinza são as originais geradas por MET e as com detalhes coloridos são imagens que foram analisadas utilizando o programa Paint 3D para evidenciar as diferenças entre as fibrilas de cada partícula. O APMV representa um vírus da linhagem A, suas fibrilas são finas e longas e estão presentes em abundância, marcadas em verde. O Borely momouvirus representa a linhagem B, apresenta poucas fibrilas finas e longas, destacadas em azul. O Megavírus 19.10 representa a linhagem C, onde observamos muitas fibrilas organizadas em torno da partícula agrupadas em pequenos tufo, destacadas de vermelho.

Ao notarmos essas diferenças procuramos observar em mais isolados de cada linhagem se o padrão se repetia. Imagens de MET de outros isolados nos permitiram reforçar a ideia de que as fibrilas realmente se apresentam com diferentes padrões de acordo com a linhagem a qual pertencem. Na figura 17 vemos três isolados de mimivírus de cada linhagem por coluna, salientando a diversidade morfológica citada.



**Figura 17 – Painele de imagens de mimivírus das linhagens A, B e C.** Em cada coluna há imagens de três representantes de cada linhagem, evidenciando as diferenças morfológicas observadas nas fibrilas dos vírus de acordo com a linhagem a qual pertencem. Os vírus da linhagem A possuem muitas fibrilas finas e longas; os da linhagem B apresentam poucas fibrilas e os da linhagem C possuem muitas fibrilas que se juntam formando aglomerados desde sua inserção no capsídeo até as pontas externas.

As imagens utilizadas para analisar as fibrilas na figura 17 fazem parte do acervo de imagens dos vírus gigantes de amebas isolados pelo GEPVIG, sendo que cada vírus foi submetido a preparação para MET separadamente. Por esse motivo, preparamos amostras contendo vírus relacionados às três diferentes linhagens juntos, com a finalidade de observar se o padrão das fibrilas se manteria em uma mesma preparação. Na figura 18, as imagens geradas como fruto dessa preparação única podem ser vistas, onde capturamos imagens dos vírus em trios ou duplas em uma mesma amostra. Portanto, a preparação não parece interferir na morfologia das fibrilas, evidenciando que as mesmas são intrinsecamente diferentes de acordo com a linhagem a qual aquele vírus pertence.



**Figura 18 – Trios ou duplas de mimivírus das diferentes linhagens em uma mesma amostra.** (A e B) Mimivírus da linhagem A, B e C organizados em trios e (C-E) imagens de diferentes duplas de mimivírus. APMV representa a linhagem A, Borely a linhagem B e Megavírus 19.10 a linhagem C. (C) Dupla composta por A+C, (D) dupla formada por A+B e (E) dupla formada por B+C. É nitidamente visível a diferença das fibrilas de cada um dos vírus nas imagens, que foram registradas de uma única amostra.

## 7 DISCUSSÃO

Desde sua descoberta e primeira descrição em 2003, os vírus gigantes se tornaram grandes impulsionadores da prospecção viral utilizando amebas em todo o mundo. O GEPVIG é o grupo pioneiro em isolamento e estudos relacionados a esses organismos no Brasil, detendo em seu banco os isolados da América Latina. Grande parte destes consiste em mimivírus, sendo que a abundância e ubiquidade destes vírus no Brasil foi mostrada em trabalhos anteriores como o de Dornas e colaboradores (2015) e Andrade e colaboradores (2017), ao descreverem muitos mimivírus que foram isolados utilizando técnicas clássicas de isolamento, em que a plataforma consiste em diferentes amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Dentre os isolados, encontram-se mimivírus que pertencem às três diferentes linhagens, sendo que em um dos trabalhos a predominância foi daqueles pertencentes a linhagem A (79,73%) seguida da linhagem C (4,35%) (DORNAS *et al.*, 2015). Ao isolarmos um mimivírus de linhagem C e observarmos o padrão de fibrilas típico destes vírus, bem como a predominância de isolamento citada anteriormente, podemos inferir que este padrão pode estar ligado ao sucesso de isolamento destes organismos, bem como os de linhagem A, uma vez que as fibrilas são mais abundantes nas partículas destes vírus e são importantes ferramentas para a adesão à célula hospedeira (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Observamos para o megavírus 19.10 um modelo de infecção exibindo um perfil mais tardio ao analisarmos seu perfil multiplicativo, e que corrobora a descrição da literatura para o *Megavirus chilensis* (ARSLAN *et al.*, 2011), um isolado também relacionado à linhagem C. Dessa forma, o tempo de coleta final utilizado na curva de ciclo único não foi capaz de mostrar qual o período pós-infecção é necessário para que a liberação das partículas se estabilize e indique as porções finais do ciclo de multiplicação desse vírus. Outras fases foram contempladas além desta, assim, futuras análises incluindo mais tempos de coleta superiores à 12 h.p.i se mostram interessantes para que a caracterização do perfil multiplicativo se torne mais robusta.

Após estudarmos o perfil multiplicativo do megavírus 19.10, várias peculiaridades chamaram a nossa atenção. Inicialmente, durante o processo de prospecção e isolamento, notamos que este mimivírus causa efeitos citopáticos mais tardiamente quando comparado a outros, como por exemplo, o APMV. Ao analisarmos a curva de ciclo único, é possível observar que a lise das células hospedeiras e conseqüentemente a liberação da progênie viral é mais

tardia. Porém, quando observamos as imagens geradas por MET (Figs. 13 e 14) para estudar o ciclo de multiplicação, encontramos em diversas células infectadas já no fim do ciclo várias vesículas no citoplasma amebiano contendo uma ou mais partículas virais em seu interior (Fig. 14 A) e, inclusive, próximas à periferia da membrana celular e a uma partícula viral já no exterior da ameba (Fig. 14 D). Isso chamou a nossa atenção para a possibilidade de exocitose como mais uma forma de liberação, além da lise celular, o que poderia explicar a lise mais tardia, uma vez que a célula pode estar liberando a progênie das duas formas, sendo a exocitose a forma primária seguida da lise mais tardiamente. Outros vírus gigantes como os orpheovírus, por exemplo, se organizam dentro de vesículas ao fim do ciclo de multiplicação e são liberados da célula hospedeira por lise e exocitose (SOUZA *et al.*, 2019). Existe também a possibilidade de a liberação ocorrer apenas de uma forma para cada célula infectada, o que mostra a necessidade de estudarmos mais a fundo esta etapa do ciclo, com a finalidade de elucidar melhor se a exocitose realmente acontece e como ela ocorre. Ao analisar as fábricas virais do orpheovírus durante a formação de novas partículas virais, Souza e colaboradores (2019) observaram a presença de membranas em seu interior, que podem ser importantes para a formação das vesículas exocíticas deste vírus. Entender a natureza das vesículas e como elas se formam também pode ser um produto dessa investigação acerca da possível exocitose do megavírus 19.10.

Outro aspecto do ciclo que chamou nossa atenção foi o fato de encontrarmos em algumas imagens o núcleo da célula hospedeira ainda com alta organização estrutural preservada já no fim do processo de multiplicação viral (Fig. 14 C). O núcleo hospedeiro sempre foi observado em estudos anteriores sobre o ciclo dos mimivírus, porém não apresentando este nível de organização citado anteriormente já no fim da formação de novas partículas (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007). Sobre a possibilidade da atuação do núcleo do hospedeiro no ciclo de multiplicação, Suzan-Monti e colaboradores (2007) sugeriram em um trabalho anterior que a primeira rodada da replicação do genoma pode ocorrer dentro dessa organela, uma vez que observaram a entrada e saída do material genético do mimivírus no núcleo antes da formação da fábrica viral. Estudos futuros sobre a possibilidade da participação do núcleo celular hospedeiro no ciclo de multiplicação dos mimivírus são necessários e podem ajudar a elucidar o porquê dessas diferenças organizacionais desta organela no caso do ciclo do megavírus 19.10.

Ao longo dos anos e dos isolamentos de mimivírus feitos utilizando amostras coletadas pelo GEPVIG, a etapa de identificação por MET sempre foi importante para a visualização das

estruturas e morfologia viral. Ao analisarmos nosso banco de imagens e de dados acerca dos isolados, a diferença no padrão de fibrilas sempre chamou nossa atenção e trouxe questionamentos sobre qual ou quais seriam os motivos por trás deste fato. Ao analisarmos as fibrilas de três mimivírus pertencentes às linhagens A, B e C reunidos em uma mesma amostra contendo apenas partículas virais, as imagens geradas por MET confirmaram nossa suspeita de que as diferenças nas fibrilas são intrínsecas à estrutura de cada um desses vírus, e que cada um dos representantes apresenta uma característica marcante exclusiva para vírus pertencentes àquela linhagem (Fig. 16). Os mimivírus relacionados a linhagem A, possuem muitas fibrilas longas recobrando seu capsídeo (Fig. 18, coluna à esquerda), ao contrário daqueles relacionados a linhagem B, em que observamos uma quantidade menor de fibrilas (Fig. 18, coluna central). Já aqueles que pertencem a linhagem C, também apresentam fibrilas em abundância, porém estas se organizam agrupadas em forma de “tufos” (Fig. 17, coluna à direita). Entender qual a implicância das fibrilas serem diferentes entre as linhagens pode trazer informações importantes sobre a biologia destes vírus e a forma como eles se relacionam com o ambiente em que vivem e com seus hospedeiros. Assim, mais estudos sobre este tópico se mostram necessários.

As análises de imagens geradas MET corroboram nossa hipótese acerca da morfologia das fibrilas ser uma importante evidência que pode ser utilizada para diferenciar os mimivírus e inferir a qual linhagem um novo isolado pode estar relacionado. Além disso, a MET se mostrou aqui uma forte aliada no processo de identificação e caracterização de novos vírus gigantes, o que é interessante, já que métodos moleculares como PCR em tempo real nem sempre resultam em resultados satisfatórios em trabalhos anteriores com a finalidade de identificar novos isolados (DORNAS *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2019). Adicionalmente à identificação por imagens, a MET também fornece um panorama de detalhes estruturais das partículas virais, possibilitando que mais de uma análise seja feita ao empregar esta metodologia.

A análise filogenética realizada neste trabalho foi capaz de corroborar nossas expectativas, agrupando o megavírus 19.10 junto aos vírus que compõem a linhagem C de mimivírus (Fig. 15) (ARSLAN *et al.*, 2011). Somados aos resultados de análise de imagens que mostraram a diferença morfológica das fibrilas, propomos que as características morfológicas podem ser consideradas como indicadores da relação de um mimivírus à uma das linhagens A, B e C.

Este trabalho traz à tona novas informações sobre os mimivírus, além da descrição de um novo isolado brasileiro. Pesquisas de base são de extrema importância para que outras áreas e aplicabilidades possam ser desenvolvidas, já que é essencial conhecer os aspectos biológicos, moleculares e filogenéticos dos organismos primariamente a qualquer possível utilização ou pesquisa posterior. Levantar informações acerca das relações filogenéticas dos mimivírus, torna a incessante busca pela compreensão da evolução viral e também de outros organismos, um passo à frente em direção à conquista deste objetivo. Os resultados aqui apresentados contribuem para o conhecimento sobre os mimivírus e os vírus gigantes de ameba, nos aproximando um pouco mais da elucidação de aspectos relacionados à compreensão de organismos tão complexos e misteriosos.

## 8 CONCLUSÕES

- Um novo mimivírus foi isolado e teve a morfologia de sua partícula avaliada por meio de microscopia eletrônica de transmissão, reforçando a importância dessa metodologia como uma aliada para estes fins.
- Análise filogenética indica o megavírus 19.10 como um mimivírus pertencente à linhagem C.
- Ensaios de curva de ciclo único indicam que o megavírus 19.10 possui ciclo mais lento em comparação ao descrito na literatura para outros mimivírus.
- O estudo das fibrilas dos mimivírus sugere que estas podem representar um possível marcador para identificação de linhagem viral.

## REFERÊNCIAS

- ABERGEL, C. *et al.* Virus-encoded aminoacyl-tRNA synthetases: structural and functional characterization of mimivirus TyrRS and MetRS. **Journal of Virology**, v 81, p. 12406–12417, 2007.
- ABERGEL, C.; LEGENDRE, M.; CLAVERIE, J. The rapidly expanding universe of giant viruses: mimivirus, pandoravirus, pithovirus and mollivirus. **Fems Microbiology Reviews**, v.39, n.6, p.779-796, 20 set. 2015.
- ABRAHÃO, J. S. *et al.* Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. **Virology Journal**, v. 11, n. 120, 30 jun. 2014a.
- ABRAHÃO, J. S. *et al.* Growing a giant: Evaluation of the virological parameters for mimivirus production. **Journal of Virological Methods**, v. 207, p.6-11, out. 2014b.
- ABRAHÃO, J. *et al.* Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. **Nature communications**, vol. 9, n. 749, 2018.
- ABRAHÃO, J. *et al.* The analysis of translation-related gene set boosts debates around origin and evolution of mimiviruses. **Plos Genetics**, v. 13, n. 2, 16 fev. 2017.
- ANDREANI, J. *et al.* Orpheovirus IHUMI-LCC2: A New Virus among the Giant Viruses. **Frontiers in microbiology**, vol 8, 2643, 2018.
- ANDRADE, A.C.S.P *et al.* Filling Knowledge Gaps for Mimivirus Entry, Uncoating, and Morphogenesis. **Journal of Virology**, v. 91, n. 22, 6 set. 2017.
- ANDRADE, A.C.S.P *et al.* New isolates of pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. **Journal of Virology**, v. 93, n. 5, p. e01942-18, 2019.
- ANDRADE, A.C.S.P. *et al.* Ubiquitous giants: a plethora of giant viruses found in Brazil and Antarctica. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, 24 jan. 2018.
- ARSLAN, D. *et al.* Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17486-91. 18 out. 2011.
- BAJRAI, L. H. *et al.* Isolation of Yasminevirus, the First Member of Klosneuvirinae Isolated in Coculture with Vermamoeba vermiformis, Demonstrates an Extended Arsenal of Translational Apparatus Components. **Journal of Virology**, v. 94, n. 1, 9 out. 2019.
- BAJRAI, L. *et al.* Kaumoebavirus, a New Virus That Clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. **Viruses**, v. 8, n. 11, p.278-288, 28 out. 2016a.
- BAJRAI, L.H. *et al.* Saudi Moumouvirus, the First Group B Mimivirus Isolated from Asia. **Frontiers in Microbiology**, v. 07, 20 dez. 2016b.
- BANDARU, V. *et al.* Human endonuclease VIII-like (NEIL) proteins in the giant DNA Mimivirus. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 11, p. 1629-1641, 2007.

- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, maio 2012.
- BARIK, S. A Family of Novel Cyclophilins, Conserved in the Mimivirus Genus of the Giant DNA Viruses. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 231-236, 2018.
- BESEMER, J. et al. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 451-454, 1 jul. 2005.
- BORATTO, P. V. M. *et al.* Niemeyer Virus: a new mimivirus group A isolate harboring a set of duplicated aminoacyl-trna synthetase genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 10 nov. 2015.
- BORATTO, P.V. M. *et al.* Yaravirus: a novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 117, n. 28, p. 16579-16586, 29 jun. 2020.
- BOSI, E. et al. MeDuSa: a multi-draft based scaffold. **Bioinformatics**, v. 31, n. 15, p. 2443-2451, 25 mar. 2015.
- BOUGHALMI, M. *et al.* High-throughput isolation of giant viruses of the Mimiviridae and Marseilleviridae families in the Tunisian environment. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2000-2007, 9 jan. 2013.
- CAMPOS, R. K. *et al.* Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p.95-105, 2014.
- COLSON, P. *et al.* Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales. **Intervirology**, v. 55, n. 5, p.321-332, 2012.
- DESNUES, C. et al. Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 109, n. 44, p.18078-18083, 15 out. 2012.
- DORNAS, F. P. *et al.* Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1086, 06 out. 2015.
- DOS SANTOS SILVA, L.K. *et al.* Isolation and genomic characterization of a new mimivirus of lineage B from a Brazilian river. **Archives of Virology**, vol. 165, p. 853–863, 2020.
- HAKIM, M. *et al.* Exploring ORFan Domains in Giant Viruses: structure of mimivirus sulfhydryl oxidase r596. **Plos One**, v. 7, n. 11, 28 nov. 2012.
- ICTV ONLINE. **Taxonomy**. 2020. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 10 jul. 2021.
- IYER, L. M. *et al.* Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p.156-184, abr. 2006.

- IYER, L. M.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p.11720-11734, dez. 2001.
- KALYAANAMOORTHY, S. *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587-589, 8 maio 2017.
- KLOSE, T. *et al.* The Three-Dimensional Structure of Mimivirus. **Intervirolgy**, v. 53, n. 5, p.268-273, 2010.
- KOONIN, E.V. Virology: gulliver among the lilliputians. **Current Biology**, v. 15, n. 5, p. 167-169, mar. 2005.
- KOONIN, E. V.; YUTIN, N. Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. **Advances in Virus Research**, p.167-202, 2019.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2 maio 2018.
- KUZNETSOV, Y. G. *et al.* Morphogenesis of Mimivirus and Its Viral Factories: an Atomic Force Microscopy Study of Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 87, n. 20, p.11200-11213, 7 ago. 2013.
- LA SCOLA, B. *et al.* A Giant Virus in amoebae. **Science**. 299: 2033. 2003.
- LEGENDRE, M. *et al.* mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Res**, v 20, p. 664–674, 2010.
- LEGENDRE, M. *et al.* Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, v. 111, n. 11, p.4274-4279, 3 mar. 2014.
- LETUNIC, I. *et al.* Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 127-128, 18 out. 2006.
- LUTHER, K.B. *et al.* Mimivirus Collagen Is Modified by Bifunctional Lysyl Hydroxylase and Glycosyltransferase Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 43701-43709, 1 nov. 2011
- LWOFF, A. The Concept of Virus. **Journal of General Microbiology**. v.17, n.1, p. 239-253. 23 ago. 1957g.
- MUTSAFI, Y. *et al.* Membrane Assembly during the Infection Cycle of the Giant Mimivirus. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 5, 30 maio 2013.
- NGUYEN, L.T. *et al.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 3 nov. 2014.
- OLIVEIRA, G.P *et al.* Putative Promoter Motif Analyses Reinforce the Evolutionary Relationships Among Faustoviruses, Kaumoebavirus, and Asfarvirus. **Frontiers Microbiology**, v. 9, n. 1041, 2018.

- PAGNIER, I. *et al.* A Decade of Improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae Isolation from Amoeba. **Intervirology**, v. 56, n. 6, p.354-363, 2013.
- PHILIPPE, N. *et al.* Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. **Science**, v. 341, p.281–286, 2013.
- PRJIBELSKI, A. *et al.* Using SPAdes De Novo Assembler. **Current Protocols In Bioinformatics**, v. 70, n. 1, jun. 2020.
- RAOULT, D. *et al.* The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. **Science**, v. 306, n. 5700, p.1344-1350, 19 nov. 2004.
- RAOULT, D.; FORTERRE, P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p.315-319, 3 mar. 2008.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**. v. 27. n. 3, p. 493-497, 1938.
- RODRIGUES, R.A *et al.* Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire. **Journal of Virology**, v.89, n. 23, dez. 2015.
- RODRIGUES, R.A.L *et al.* Morphologic and Genomic Analyses of New Isolates Reveal a Second Lineage of Cedratviruses. **Journal of Virology**, v. 92, n. 13, p. 1-13, 25 abr. 2018a.
- RODRIGUES, R. A. L. *et al.* “Tupanvirus”, a new genus in the family Mimiviridae. **Archives of Virology**, v. 164, n. 1, p.325-331, 5 out. 2018b.
- ROLLAND, C, *et al.* Discovery and Further Studies on Giant Viruses at the IHU Mediterranean Infection That Modified the Perception of the Virosphere. **Viruses**, v.4, n. 312, mar. 2019.
- SAINI, H.*et al.* Structural and functional insights into Mimivirus ORFans. **Bmc Genomics**, v. 8, n. 1, p. 115-118, 2007.
- SCHRAD, J.R. *et al.* Structural and Proteomic Characterization of the Initiation of Giant Virus Infection. **Cell**, v. 181, p. 1046–1061. 28 maio 2020.
- SCHULZ, F, *et al.* Advantages and Limits of Metagenomic Assembly and Binning of a Giant Virus. **mSystems**, v.5, n.3, p. e00048, 20 jun. 2020.
- SHAH, N. *et al.* Exposure to Mimivirus Collagen Promotes Arthritis. **Journal of Virology**, v. 88, n. 2, p. 838-845, jan. 2014
- SHUKLA, A. *et al.* The number of genes encoding repeat domain-containing proteins positively correlates with genome size in amoebal giant viruses. **Virus Evolution**, v. 4, n. 1, 1 jan. 2018.
- SILVA, L.C. *et al.* Modulation of the expression of mimivirus-encoded translation-related genes in response to nutrient availability during *Acanthamoeba castellanii* infection. **Frontiers Microbiology**, v 6, p 539, 2015.

- SILVA, L.K.S. *et al.* Isolation and genomic characterization of a new mimivirus of lineage B from a Brazilian river. **Archives of Virology**, v. 165, n. 4, p. 853-863, 12 fev. 2020.
- SOBHY, H. *et al.* Identification of giant Mimivirus protein functions using RNA interference. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 28 abr. 2015.
- SOUZA, F. *et al.* In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus. **Virology Journal**, v. 16, n. 16, p. 158, 2019.
- SUZAN-MONTI, M. *et al.* Ultrastructural Characterization of the Giant Volcano-like Virus Factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **Plos One**, v. 2, n. 3, 28 mar. 2007.
- SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p.145-155, abr. 2006.
- TAKAHASHI, H. *et al.* Morphological and Taxonomic Properties of the Newly Isolated Cotonvirus japonicus, a New Lineage of the Subfamily Megavirinae. **Journal of Virology**, v. 95, n. 18, p. e00919-21, 2021.
- THAI, V. *et al.* Structural, Biochemical, and in Vivo Characterization of the First Virally Encoded Cyclophilin from the Mimivirus. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 1, p. 71-86, abr. 2008.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4576-4579, Jun. 1990.
- XIAO, C. *et al.* Cryo-electron Microscopy of the Giant Mimivirus. **Journal of Molecular Biology**, v.353, n.3, p.493-496, out. 2005.
- XIAO, C. *et al.* Structural Studies of the Giant Mimivirus. **Plos Biology**, v. 7, n. 4, p. 959-966, 28 abr. 2009.
- YOOSUF, N. *et al.* Related Giant Viruses in Distant Locations and Different Habitats: *Acanthamoeba polyphaga* mousmouvirus Represents a Third Lineage of the Mimiviridae That Is Close to the Megavirus Lineage. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n.12, p. 1324–1330. 4 dez. 2012.
- YOSHIKAWA, G. *et al.* Medusavirus, a Novel Large DNA Virus Discovered from Hot Spring Water. **Journal of Virology**, v.93, n.8, 6. fev. 2019.
- ZAUBERMAN, N. *et al.* Distinct DNA Exit and Packaging Portals in the Virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. **Plos Biology**, v. 6, n. 5, 13 mai. 2008.

## ANEXOS

**Anexo 1** - Protocolo de preparação do meio de cultura peptona/extrato de levedura/glicose (PYG).

- 1- Os componentes do meio PYG foram pesados na quantidade adequada para o volume de meio a ser produzido:

**Tabela 1-** Reagentes utilizados para a confecção do meio PYG.

| <b>Componente</b>  | <b>Concentração (g/litro)</b> |
|--|-------------------------------|
| Sulfato de Magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )<br>(Merck, Alemanha)                 | 0,98g/litro                   |
| Cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) (Merck, Alemanha)   | 0,06g/litro                   |
| Glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Quimibrás, Brasil)   | 9,0 g/litro                   |
| Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado<br>( $Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$ ) (Merck, Alemanha) | 0,02g/litro                   |
| Fosfato dibásico de sódio heptahidratado<br>( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ) (Merck, Alemanha)        | 0,40g/litro                   |
| Fosfato monobásico de potássio ( $KH_2PO_4$ ) (Merck,<br>Alemanha)                               | 0,34g/litro                   |
| Citrato de sódio dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )<br>(Quimibrás, Brasil)              | 1,00g/litro                   |
| Protease peptona (extrato bactopectona) (Becton<br>Dickinson, E.U.A)                             | 20,0g/litro                   |
| Extrato de levedura (Becton Dickinson, E.U.A)  | 2,0g/litro                    |

- 2- Em seguida, os componentes foram misturados à água destilada e homogeneizados utilizando agitador magnético.
- 3- Após a homogeneização e o ajuste do volume correto, o pH do meio foi ajustado para 6,5, com auxílio do do pHmêtro.
- 4- Em seguida, o meio foi filtrado em filtro de café para remoção de restos de materiais não diluídos e, então, encaminhado para a esterilização (autoclave).
- 5- Os meios autoclavados foram submetidos a testes de esterilização e em seguida armazenados em câmara fria até o momento do uso.

**Anexo 2-** Disciplinas e carga horária cursadas durante o mestrado.**Tabela 2-** Disciplinas cursadas ao longo do mestrado.

| <b>Disciplina</b>                         | <b>Ano/Semestre</b> | <b>Créditos</b> |
|---|---------------------|-----------------|
| Tópicos Especiais em Microbiologia A      | 2019/1              | 02              |
| Bacteriologia                             | 2019/1              | 06              |
| Tópicos Especiais em Microbiologia A      | 2019/2              | 02              |
| Tópicos Especiais em Microbiologia B      | 2019/2              | 02              |
| Microbiologia Ambiental                   | 2019/2              | 03              |
| Micologia Médica                          | 2019/2              | 03              |
| Treinamento Didático em Microbiologia I   | 2019/2              | 02              |
| Tópicos Especiais em Microbiologia A      | 2020/1              | 02              |
| Tópicos Especiais em Microbiologia C      | 2020/1              | 03              |
| Micologia Geral                           | 2020/1              | 03              |
| Tópicos Transversais de Pós-graduação III | 2020/1              | 03              |

|                             |        |    |
|-----------------------------|--------|----|
| Seminários em Microbiologia | 2020/1 | 02 |
|-----------------------------|--------|----|

---

|                          |  |           |
|--------------------------|--|-----------|
| <b>Total de créditos</b> |  | <b>33</b> |
|--------------------------|--|-----------|