

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Talita Bastos Machado

ISOLAMENTO DE VÍRUS GIGANTES EM BIOMAS BRASILEIROS

Belo Horizonte
2021

TALITA BASTOS MACHADO

ISOLAMENTO DE VÍRUS GIGANTES EM BIOMAS BRASILEIROS

Versão Final

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

Orientador: Prof. Jônatas Santos Abrahão

Coorientadora: Dra. Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade.

Belo Horizonte

2021

- 043 Machado, Talita Bastos.
Isolamento de vírus gigantes em biomas brasileiros [manuscrito] / Talita Bastos Machado. - 2021.
122 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Jônatas Santos Abrahão. Coorientadora: Dra. Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Mimiviridae / isolamento & purificação. I. Abrahão, Jônatas Santos. II. Andrade, Ana Cláudia dos Santos Pereira. 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 DE MESTRADO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE TALITA BASTOS MACHADO

Nº REGISTRO: 2019706339

Às 14:00 horas do dia **09 de AGOSTO de 2021**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Juliana Reis Cortines (Universidade Federal do Rio de Janeiro), Marcelo Henrique Aguiar De Freitas (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA – Brasília) e o Prof. Jônatas Santos Abrahão – Orientador, para julgar o trabalho final “Isolamento de vírus gigantes em biomas brasileiros”, da aluna **Talita Bastos Machado**, 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. Juliana Reis Cortines

Dr. Marcelo Henrique Aguiar De Freitas

De acordo:

Prof. Jônatas Santos Abrahão

(orientador)

Profa. Danielle da Glória de Souza

(Coordenadora do PPGM/UFMG)

Belo Horizonte, 09 de agosto de 2021



Documento assinado eletronicamente por **Jonatas Santos Abrahao, Professor do Magistério Superior**, em 10/08/2021, às 11:27, 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 10/08/2021, às 13:49, 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 **Marcelo Henrique Aguiar de Freitas, Usuário Externo**, em 18/08/2021, às 15:56, 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 **Juliana Reis Cortines, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 14:08, 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, informando o código verificador **0871967** e o código CRC **2C882F2B**.

DEDICATÓRIA

Às minhas meninas, Pâmela e Bianca, e ao meu lindo, Agnello, por me ensinarem o que é o amor e por sempre me lembrarem que eu não estou sozinha.

AGRADECIMENTOS

Às minha irmãs, Pâmela e Bianca, por serem as mulheres mais incríveis que conheço, por terem me ensinado o que é amar incondicionalmente e de forma incalculável, por serem minha rocha nos momentos mais difíceis, por serem minhas amigas além de tudo, e por acreditarem em mim muito mais do que eu mesma;

Ao meu amor, Agnello, por toda força e paciência, por toda a dedicação, por me amar mesmo cheia de defeitos, por sempre me incentivar e me apoiar em todas as minhas escolhas, por me fazer feliz e sempre estar ao meu lado;

À minha mãe, Silvana, por me ensinar a ser forte e guerreira, correr atrás dos meus objetivos e não desistir. Até hoje, quando eu coloco uma ideia na cabeça, eu vou atrás, da mesma forma que minha mãe fez a vida inteira. E ao Edney, pelo tempo em que nosso relacionamento ainda era bom e eu conseguia sentir seu amor e preocupação de pai;

Aos meus melhores amigos, Mari e Chico, por terem me suportado a graduação inteira, sempre me apoiando em todos os sentidos. E por ainda me suportarem. Agradeço também às famílias de ambos, por todo o carinho, e por sempre me acolherem como parte da família, principalmente quando eu sentia que não tinha uma;

À tia Ci, tio Joel e suas filhas, por terem ajudado durante muitos anos com a minha criação e das minhas irmãs e, com certeza, foram fundamentais nas nossas vidas. Eu não consigo expressar o tamanho da minha gratidão e do meu amor por cada um;

Aos meus filhos pets, inclusive os que já deixaram este mundo, por terem me amado de forma tão intensa e incondicional e me ajudado a superar muitos momentos difíceis, por sempre me escutarem e me darem carinho, de forma tão natural e pura, que só nossos pets sabem fazer;

À Patrícia, por ser uma psicóloga incrível, que soube me ajudar da melhor forma em um momento que parecia que tudo estava desmoronando e foi fundamental para que eu conseguisse me reerguer e continuar lutando;

Ao meu orientador Jônatas, por ter me dado essa oportunidade e por ser um excelente orientador, por saber coordenar um grupo com tantas pessoas diferentes e conseguir criar um ambiente saudável em que todo mundo se ajuda;

À minha coorientadora Ana Cláudia, que me atura desde a Iniciação Científica e sempre teve paciência para me ensinar tudo, me acolheu de todo coração e sempre foi carinhosa. Sou muito feliz e satisfeita por ter tido a Ana como minha “mãe científica”;

Aos meus colegas do grupo GEPVIG, por todo o apoio, colaboração e companheirismo sempre. Me deixam orgulhosa em dizer que eu faço parte do melhor grupo de pesquisa. Em especial, agradeço às minhas meninas Gepmigas, Isabella e Bruna, que se tornaram grandes amigas e eu já não me vejo mais sem elas, desejo carregá-las para sempre, e agradeço também à Fê por todo carinho, dedicação, pelo seu coração enorme e por toda a ajuda todo o tempo que estivemos juntas;

À todos os colegas do Laboratório de Vírus, que foi onde conheci pessoas incríveis que com certeza contribuíram demais para o meu crescimento pessoal e profissional, agradeço em especial ao Erik, que me ajudou demais em vários momentos e já me pagou vários lanches;

À todos os professores do Lab Vírus, Erna, Cláudio, Giliane e Betânia por enriquecer nosso conhecimento tanto em reuniões quanto em disciplinas;

Ao Centro de Microscopia da UFMG, que foi fundamental para este trabalho e possui técnicos muito bem preparados, agradeço em especial ao Denilson, Rodrigo, Altair, Ney e Marilene, mas também a todos os outros da equipe que fazem este trabalho maravilhoso;

A todas as pessoas que ajudaram com as coletas das amostras que me permitiram realizar este trabalho;

À Débora e ao Tiago, que estão sempre dispostos a nos ajudar e fazem um ótimo trabalho;

À banca avaliadora pela disponibilidade e pela colaboração na fase final deste trabalho;

Às agências de fomento, CAPES, CNPq E FAPEMIG pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho;

Obrigada!

Do.

Or do not.

There is no try.

(Master Yoda)

RESUMO

A descoberta do primeiro vírus gigante associado a amebas descrito em 2003 e denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), impulsionou uma crescente busca por novos vírus gigantes resultando na descoberta de vários outros grupos que atualmente compõem o grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDVs). Apesar do interesse por esses vírus ter crescido nos últimos anos, pouco se sabe ainda a respeito da sua diversidade e distribuição na natureza, bem como de suas relações ecológicas e filogenéticas. Sabendo da importância do isolamento de novos vírus para expansão do nosso conhecimento sobre a virosfera, este trabalho visou realizar estudos de prospecção através da inoculação direta de amostras de água doce, água salgada, solo, lama e esgoto coletadas de diferentes biomas brasileiros em culturas de amebas da espécie *Acanthamoeba castellanii* e posterior identificação dos novos isolados a partir de imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foram processadas 641 alíquotas obtidas a partir de 163 amostras que foram coletadas nos estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, abrangendo todos os biomas brasileiros: Cerrado (57,57%), Mata Atlântica (30,89%), Caatinga (3,12%), Amazônia (3,12%), Pampa (1,5%), Pantanal (0,62%), além de amostras com o bioma não identificado. Dentre elas, 459 alíquotas foram obtidas a partir de água doce (71,6%), 60 de água salgada (9,4%), 2 de solo (0,3%), 10 de lama (1,6%) e 110 de esgoto (17,2%). Foram obtidos 67 novos isolados virais (taxa de isolamento de 10,45%), pertencendo a pelo menos 5 grupos virais diferentes: 13 Mimivírus, 26 Marseillevírus, 1 Pandoravírus, 9 Cedratvírus, 3 Yaravírus e 15 *Pithoviridae*-like. Essa técnica de isolamento se mostrou eficaz. No presente estudo foram obtidos novos isolados de todos os tipos de amostras e de todos os biomas testados, além de terem sido isolados vários grupos virais, com diferentes morfologias e tamanhos, inclusive um vírus completamente novo na virosfera, o Yaravírus. Em comparação com outros estudos similares, o presente trabalho obteve maior riqueza de grupos isolados em *A. castellanii*, sendo a maioria representantes da família *Marseilleviridae*. Os achados do presente trabalho demonstram o quanto os estudos de prospecção são importantes para a expansão do conhecimento sobre a virosfera, uma vez que o isolamento de novos vírus nos ajudam a compreender a diversidade, distribuição e riqueza dos vírus de amebas na natureza, além de contribuírem para a realização de estudos relacionados ao ciclo de multiplicação e filogenia.

Palavras-chaves: Vírus gigantes, Prospecção, Mimivírus, Marseillevírus, Cedratvírus, Pandoravírus, Yaravírus, *Pithoviridae*-like.

ABSTRACT

The discovery of the first giant amoeba-associated virus described in 2003, called *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), has spurred a growing search for new giant viruses resulting in the discovery of several other groups that currently make up the group of Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses (NCLDVs). Although the interest in those viruses has grown in recent years, little is known about their diversity and distribution in nature, as well as their ecological and phylogenetic relationships. Knowing the importance of isolating new viruses to expand our knowledge about the virosphere, this work aimed to carry out prospecting studies in samples as fresh water, salt water, soil, mud and sewage, collected from different Brazilian biomes. Those samples were inoculated in cultures of amoebas of the species *Acanthamoeba castellanii* aiming for virus isolation. Further identification of the new isolates were performed by transmission and scanning electron microscopy images. A total of 641 aliquots were processed from 163 samples collected in the states of Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina and São Paulo, covering all Brazilian biomes : Cerrado (57.57%), Atlantic Forest (30.89%), Caatinga (3.12%), Amazon (3.12%), Pampa (1.5%), Pantanal (0.62%), in addition to samples with the unidentified biome. Among them, 459 aliquots were obtained from fresh water (71.6%), 60 from salt water (9.4%), 2 from soil (0.3%), 10 from mud (1.6%) and 110 from sewage (17.2%). A total of 67 new isolates were obtained (isolation rate of 10.45%), belonging to at least 5 different viral groups: 13 Mimiviruses, 26 Marseilleviruses, 1 Pandoravirus, 9 Cedratviruses, 3 Yaraviruses and 15 *Pithoviridae*-like. This isolation method was effective, since new isolates were obtained from all types of samples and from all biomes tested, in addition to having isolated several viral groups, with different morphologies and sizes, including a completely new virus in the virosphere, the Yaravirus. In comparison with other similar studies, the present work obtained a greater richness of isolated groups in *A. castellanii*, most of which were representatives of the *Marseilleviridae* family. The findings of this work demonstrate how important prospection studies are for the expansion of knowledge about the virosphere, since the isolation of new viruses helps us to understand the diversity, distribution and richness of amoeba viruses in nature, as well as contribute to studies related to the replication cycle and phylogeny.

Keywords: Giant viruses, Prospection, Mimivirus, Marseillevirus, Cedratvirus, Pandoravirus, Yaravirus, *Pithoviridae*-like.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das origens dos vírus de DNA dupla-fita	23
Figura 2. Cocos de Bradford	24
Figura 3. Partículas de Mimivírus	25
Figura 4. Mapa representativo da distribuição dos isolados da família <i>Mimiviridae</i> no mundo	28
Figura 5. Partículas de Tupanvírus	29
Figura 6. Árvore filogenética da família <i>Mimiviridae</i>	30
Figura 7. Partículas de yasminevírus	31
Figura 8. Imagem representativa do ciclo de multiplicação do APMV	32
Figura 9. Modelo para a morfogênese do APMV	33
Figura 10. Modelo de incorporação do genoma e aquisição de fibrilas em mimivírus	33
Figura 11. Presença da Área de Aquisição de Fibrilas (AAF) na periferia da fábrica viral (FV)	34
Figura 12. Modelo mais atual do ciclo de multiplicação dos mimivírus	35
Figura 13. Partículas de Marseillevírus	36
Figura 14. Detalhes da partícula dos marseillevírus	36
Figura 15. Mapa dos isolados de marseillevírus no mundo	38
Figura 16. Vias de penetração para os marseillevírus	39
Figura 17. Ameba infectada por Marseillevírus	40
Figura 18. Esquema representativo do ciclo de multiplicação dos marseillevírus	41
Figura 19. Partículas de pandoravírus	42
Figura 20. Ciclo de multiplicação dos pandoravírus observado por imagens de MET	44
Figura 21. Partícula de pithovírus	45
Figura 22. Ciclo de multiplicação dos pithovírus observado por imagens de MET	47
Figura 23. Partículas de Cedratvírus	48
Figura 24. Características do capsídeo dos cedratvírus	49
Figura 25. Árvore filogenética com os cedratvírus	50
Figura 26. Fábrica viral do cedratvírus getuliensis	51
Figura 27. Espessamento das partículas do cedratvírus getuliensis	51
Figura 28. Estruturas amorfas elétron-densas	52
Figura 29. Esquema geral do ciclo de multiplicação dos cedratvírus	53
Figura 30. Formas de vida da <i>Acanthamoeba</i>	54

Figura 31. Trofozoítos e cistos	55
Figura 32. Partículas de mollivírus	57
Figura 33. Partículas de faustovírus	58
Figura 34. Partículas de kaumoebavírus	59
Figura 35. Partículas de pacmanvírus	59
Figura 36. Partículas de orpheovírus	60
Figura 37. Partícula do medusavírus	61
Figura 38. Mapa representativo da distribuição dos vírus gigantes de ameba no mundo	62
Figura 39. Painel de alguns vírus gigantes isolados no Brasil	65
Figura 40. Esquema representando as etapas da técnica de isolamento	73
Figura 41. Mapa com a distribuição das coleções	78
Figura 42. Coleções e tipos de amostras	81
Figura 43. Biomas e tipos de amostras	83
Figura 44. Painel com imagens de MET e MEV de cada um dos isolados obtidos neste trabalho	85
Figura 45. Novos isolados	99
Figura 46. Gráficos com informações sobre os novos isolados	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os NCLDV's	21
Tabela 2. Coleções de Amostras	79
Tabela 3. Novos isolados	100
Tabela 4. Meio PYG	119
Tabela 5. Disciplinas cursadas durante o mestrado	122

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAF:** Área de Aquisição de Fibrilas (ou FAA do inglês “Fibril Acquisition Area”)
- APMV:** Acanthamoeba polyphaga mimivírus
- AMAV:** Amazônia vírus
- ATCC:** “*American type culture collection*”
- ARM:** Área rica em membrana (ou MRA do inglês “membrane rich area”)
- AVL:** Amebas de vida livre
- BrMsV:** Brazilian marseillevírus
- BsV:** Bodo saltans vírus
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- ETAR:** Estação de Tratamento de Águas Residuais
- GBM:** Giant blood marseillevírus
- G+C:** Bases nitrogenadas guanina e citosina
- GEPVIG:** Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes
- ICTV:** Comitê Internacional de Taxonomia Viral (do inglês “International committee on taxonomy of viruses”)
- Kb:** Kilobase
- KROV:** Kroon vírus
- Mb:** Megabase
- MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- MG:** Minas Gerais
- M.O.I:** Multiplicidade Ótima de Infecção
- MsV:** Marseillevírus marseillevírus
- NCLDV:** Vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA (do inglês “Nucleo-cytoplasmic large DNA viruses”)
- Nm:** Nanômetro
- NYMV:** Niemeyer vírus
- OLPV 1:** Organic Lake phycodnavírus 1
- OLPV 2:** Organic Lake phycodnavírus 2
- ORFs:** Janelas abertas de leitura (do inglês, “Open Reading Frames”)
- PAS:** Page’s amoeba saline
- Pb:** Pares de bases

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico.

PBS: Tampão fosfato salina (do inglês, “Phosphate Buffer Saline”)

PGV: Phaeocystis globosa vírus

PYG: Meio de peptona, extrato de levedura e glicose (do inglês, “Peptone yeast extract glucose medium”)

q.s.p.: Quantidade suficiente para

SC: Santa Catarina

SMBV: Samba vírus

TGH: Transferência Gênica Horizontal

U: Unidades

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

FV: Fábrica viral (ou VF do inglês “Viral factory”)

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	20
1.1- O grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV) e a importância da descoberta dos vírus gigantes para a virosfera	20
1.2 - A família Mimiviridae	23
1.2.1- A descoberta do primeiro vírus gigante de ameba e suas principais características	23
1.2.2- Diversidade da família Mimiviridae	26
1.2.3- Ciclo de multiplicação	31
1.3- Família Marseilleviridae	35
1.3.1- Descoberta e principais características	35
1.3.2- Diversidade da família Marseilleviridae	37
1.3.3- Ciclo de multiplicação	39
1.4- Pandoravírus	41
1.4.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo	41
1.4.2- Ciclo de multiplicação	43
1.5- Pithovírus	45
1.5.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo	45
1.5.2- Ciclo de multiplicação	45
1.6- Cedratvírus	47
1.6.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo	47
1.6.2- Ciclo de multiplicação	50
1.7- Espectro de hospedeiros dos vírus gigantes	53
1.7.1- Acanthamoeba castellanii e suas características básicas	55
1.8- Isolamento e distribuição de outros vírus gigantes no mundo	56
1.8.1- Mollivírus	56
1.8.2- Faustovírus	57
1.8.3- Kaumoebavírus	58
1.8.4- Pacmanvírus	59
1.8.5- Orpheovírus	60
1.8.6- Medusavírus	60
1.9- Prospecção de vírus gigantes no Brasil	62
2 - JUSTIFICATIVA	66
3 - OBJETIVOS	68
3.1- Objetivo geral	68
3.2- Objetivos específicos	68
4 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO	69
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	70
5.1- Prospecção de Vírus Gigantes	70
5.1.1- Sistema celular	70
5.1.2- Coleta das amostras e organização das coleções	70
5.1.3- Técnica de isolamento (Prospecção)	71

5.2- Preparação do Pool-Semente	74
5.3- Titulação	74
5.4- Identificação dos novos isolados	74
5.4.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão	75
5.4.2- Microscopia Eletrônica de Varredura	76
5.4.3- Critérios utilizados para a classificação dos grupos virais	76
6- RESULTADOS	77
6.1 - Caracterização e descrição das coleções	78
6.2 - Identificação dos novos isolados	84
6.3 - Caracterização dos isolados	100
7 - DISCUSSÃO	103
8 - CONCLUSÃO	107
9 - PERSPECTIVAS	108
10 - EVENTOS E PRODUÇÕES	109
11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
12 - ANEXOS	119

1 - INTRODUÇÃO

1.1- O grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV) e a importância da descoberta dos vírus gigantes para a virosfera

A classificação tradicional de vírus os define como entidades ultramicroscópicas e filtráveis em filtro de 0,2 µm, além de possuírem um pequeno genoma que codifica poucas dezenas de proteínas e serem completamente dependentes da maquinaria celular do hospedeiro o qual infectam, sendo considerados portanto, parasitas intracelulares obrigatórios (Lwoff, 1957). A descoberta do grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDV - do inglês *Nucleo-cytoplasmic large DNA viruses*) rompeu com muitos paradigmas acerca do que se conhecia sobre a virosfera até então (Iyer et al, 2001; Koonin e Yutin, 2010). O grupo ganhou maior notoriedade com a descoberta do *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), um vírus que possui partículas com aproximadamente 750 nm e um genoma com 1,2 megabases (Mb) (La scola, 2003; Raoult et al, 2004). Essas características já contradizem três conceitos iniciais pois, é possível a visualização destes vírus por microscopia óptica, eles são retidos em filtro de 0,2 µm e seu genoma é maior que o genoma dos outros vírus já conhecidos e de algumas bactérias como *Mycoplasma genitalium* (580 kpb), *Ureaplasma urealyticum* (752 kpb) *Buchnera sp.* (641 kpb) e *Wigglesworthia brevialpilis* (698 kpb) (La scola et al, 2003).

Por serem ubíquos e infectarem uma enorme gama de hospedeiros, o grupo dos NCLDVs vem aumentando com o constante isolamento de novos vírus. Atualmente o grupo é composto pelas famílias *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*, além de alguns vírus que ainda não foram alocados em nenhuma família como os pandoravírus, pithovírus, faustovírus, mollivírus, cedratvírus, kaumoebavírus, pacmanvírus, orpheovírus e medusavírus (Tabela 1) (Philippe et al., 2013; Legendre et al., 2014; Reteno et al, 2015; Legendre et al, 2015; Andreani et al, 2016; Bajrai et al, 2016; Andreani et al, 2017; Andreani et al, 2018; Yoshikawa et al, 2019). As famílias de NCLDVs até então reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV - do inglês “International committee on taxonomy of viruses”) foram recentemente agrupadas no filo *Nucleocytoviricota*, no domínio *Varidnaviria*, reino *Bamfordvirae* (Gorbalenya et al, 2020).

Tabela 1. Os NCLDV. Membros do grupo dos Vírus Grandes Nucleocitoplasmáticos de DNA e algumas características principais. **Fonte:** Adaptado de Koonin e Yutin, 2010. *Vírus que fazem parte do grupo dos NCLDV mas ainda não foram incluídos em nenhuma família reconhecida pelo ICTV.

Família/Membros	Hospedeiro	Tamanho do genoma (Kb)	Sítio de multiplicação
<i>Phycodnaviridae</i>	Algas	150-400	Núcleo e Citoplasma
<i>Poxviridae</i>	Insetos, répteis, aves, mamíferos	130-380	Citoplasma
<i>Asfarviridae</i>	Mamíferos	170	Citoplasma
<i>Ascoviridae</i>	Insetos	150-190	Núcleo e Citoplasma
<i>Iridoviridae</i>	Insetos, vertebrados de sangue frio	100-220	Núcleo e Citoplasma
<i>Mimiviridae</i>	<i>Acanthamoeba sp.</i> e <i>Vermamoeba vermiformis</i> , <i>Cafeteria robergensis</i> , <i>Bodo saltans</i> , peixes	1.180-2.100	Citoplasma
<i>Marseilleviridae</i>	<i>Acanthamoeba sp.</i>	346-386	Citoplasma
Pandoravírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	1.900-2.500	Citoplasma
Pithovírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	610	Citoplasma
Faustovírus*	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	462	Citoplasma
Mollivírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	651	Perinuclear
Cedratvírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	589	Citoplasma
Kaumobavírus*	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	350	Citoplasma
Pacmanvírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	395	Citoplasma
Orpheovírus*	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	1473	Citoplasma
Medusavírus*	<i>Acanthamoeba sp.</i>	381	Núcleo e Citoplasma

A virosfera como um todo possui um perfil polifilético. Não é conhecido nenhum gene capaz de indicar uma origem em comum para todos os vírus. Entretanto, dentro dos NCLDV, existe um conjunto de genes chamado de “*core genes*” que representam alguns genes que são compartilhados por todos os membros do grupo sugerindo, portanto, uma provável ancestralidade comum (Koonin et al. 2006). Esses vírus codificam genes de proteínas necessárias para a transcrição, como DNA polimerases, helicases, chaperonas e topoisomerasas, tornando esses vírus parcialmente independente do sistema transcricional da célula hospedeira (Koonin & Yutin, 2010; Raoult et al, 2004; Yutin et al, 2009). Além dos “*core genes*”, esse vírus compartilham outras características como tamanho total da partícula, semelhanças no ciclo de multiplicação e no arranjo estrutural de proteínas que compõem o capsídeo, o genoma tem um tamanho relativamente grande, quando comparado a genomas de

outros vírus, todas essas características juntas indicam um perfil hipoteticamente monofilético para os NCLDV's e devido a esse provável monofiletismo alguns pesquisadores propuseram a criação de uma nova ordem, denominada *Megavirales*, para abrigar todos os vírus desse grupo (Colson et al, 2012, Colson et al, 2013).

Recentemente, o ICTV reorganizou a classificação geral de todos os vírus, e os NCLDV's passaram então a se agrupar dentro do Domínio *Varidnaviria*, Reino *Bamfordvirae*, Filo *Nucleocytoviricota* e Classe *Megaviricetes* (Gorbalenya et al, 2020).

Essa nova reorganização gerou um debate também sobre a possível criação de um quarto domínio da vida, ao lado de *Eukarya*, *Bacteria* e *Archaea*. Em 2010, Boyer e colaboradores propuseram que a melhor forma de classificação dos domínios da vida seria através de análises filogenéticas envolvendo genes relacionados com o processamento do DNA, pois estes são comuns tanto para os vírus quanto para todos os outros organismos celulares, ao contrário do que era comumente utilizado baseado na presença de ribossomos, uma vez que essa característica estava presente apenas em organismos celulares, e portanto, excluindo os vírus. Dessa forma, foi sugerido que os NCLDV's comporiam um quarto domínio da vida, separado dos outros três já existentes (Boyer et al, 2010).

Entretanto, o isolamento de novos vírus de amebas contribuiu para a expansão do conhecimento acerca dos NCLDV's, possibilitando a realização de novas análises, o que levou outros pesquisadores a refutar essa hipótese do quarto domínio da vida. Em 2014, Yutin e colaboradores realizaram uma nova reconstrução filogenética, incluindo novos grupos de vírus de amebas (*Pandoravírus* e *Pithovírus*), suas análises demonstraram que, ao contrário do que dizia a hipótese do quarto domínio, os genes universais dos vírus gigantes foram adquiridos independentemente por cada grupo através de seu hospedeiro eucariótico, ou seja, não possuíam uma origem em comum (Yutin et al, 2014). Posteriormente, novos estudos foram realizados com uma variedade maior de vírus de DNA fita-dupla, confirmando a hipótese de que os vírus não possuem uma origem em comum, corroborando com os argumentos contrários à hipótese do quarto domínio da vida (Koonin et al, 2015). O estudo de Koonin e Yutin, em 2018, coloca em perspectiva duas hipóteses sobre a origem dos NCLDV's, uma de que eles possuíam uma origem em comum, partindo do nível celular e perdendo complexidade ao longo do processo evolutivo; outra hipótese, defendida pelos autores e por outros grupos de pesquisa (Rodrigues et al, 2021), vai no caminho oposto, assumindo que os NCLDV's possuem uma origem independente, partindo de vírus mais simples que foram ganhando genes (a partir do seu hospedeiro) e aumentando sua complexidade ao longo do processo evolutivo (Figura 1) (Koonin e Yutin, 2018; 2019).

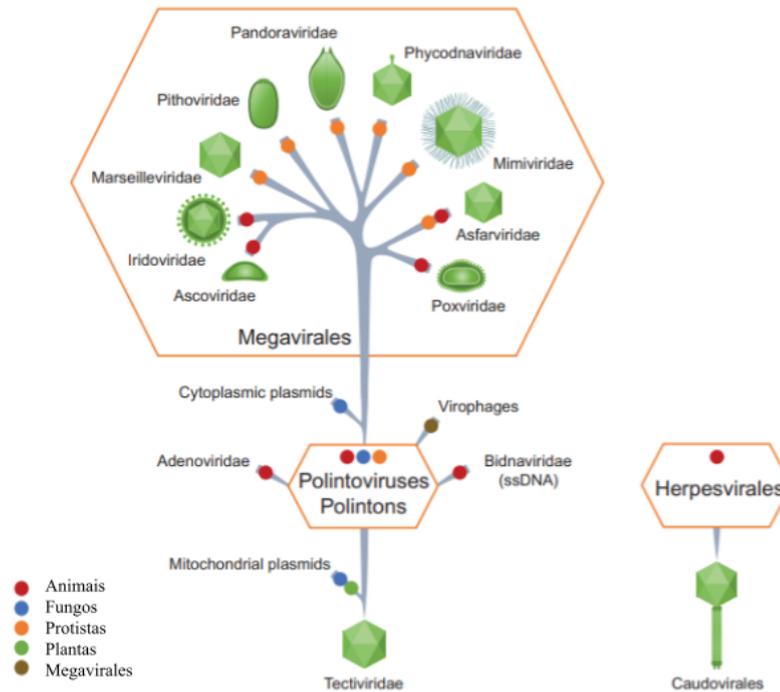


Figura 1. Esquema representativo das origens dos vírus de DNA dupla-fita. Os polintons são prováveis intermediários entre ancestrais procarióticos, semelhantes ao Tectivírus, e os vírus de DNA dupla-fita, originando uma grande variedade de vírus com tamanhos amplamente diferentes, dentre eles os virófagos e os NCLDV. A figura inclui a origem dos herpesvírus (Herpesvirales), mesmo sendo distinta da origem dos NCLDV, para que se tenha o cenário completo da evolução dos vírus de DNA dupla-fita. Os pontos na figura indicam os hospedeiros de cada vírus, cada um representado por uma cor. **Fonte:** Adaptado de Koonin e Yutin, 2019.

1.2 - A família *Mimiviridae*

1.2.1- A descoberta do primeiro vírus gigante de ameba e suas principais características

Em 1992, ocorreu um surto de pneumonia em um hospital da cidade de Bradford, na Inglaterra, no qual o agente etiológico era desconhecido. A fim de investigar o caso, foram realizadas coletas de amostras das torres de resfriamento de ar condicionado desse hospital e essas amostras foram analisadas pelo Dr. Tim Rowbothan e seus colaboradores no Laboratório de Saúde Pública em Leeds, Inglaterra. Rowbothan realizou a inoculação dessas amostras em culturas de *Acanthamoeba sp.* e ao observar o resultado do teste de Gram, comumente feito para identificação de bactérias, ele esperava encontrar bactérias gram-negativas que são comuns para pneumonia, como *Legionella sp.*, entretanto, ele encontrou na verdade organismos que se assemelhavam a cocos gram-positivos que foram chamados de “cocos de Bradford” por causa da cidade na qual foram isolados (Figura 2) (Raoult et al, 2007).

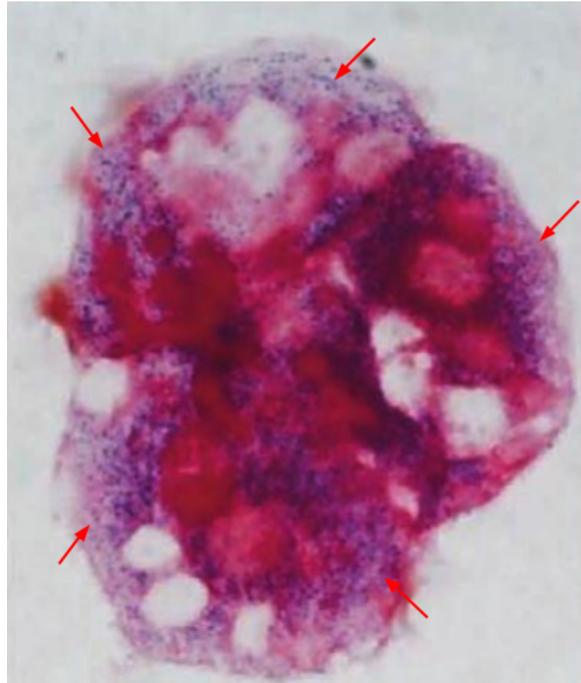


Figura 2. Cocos de Bradford. Observação dos “cocos de Bradford” (pequenos pontos roxos indicados pelas setas vermelhas) no interior de uma ameba após a coloração de Gram. **Fonte:** Adaptado de Raoult, La Scola e Birtles, 2007.

Inúmeras tentativas de identificação deste agente etiológico foram realizadas como: cultura e isolamento, testes com antibióticos, PCR e sequenciamento do gene 16S para bactérias, porém, todas as tentativas foram frustradas. Esse microrganismo foi então estocado e ficou esquecido por cerca de 10 anos, até que em 2003 um grupo de pesquisadores da Faculdade de Medicina da Aix Marseille Université da França, realizou uma microscopia eletrônica dessas amostras e se surpreendeu com o resultado. Eles descobriram que aquele agente etiológico era na verdade um vírus, não uma bactéria (Figura 3A). Esse resultado foi confirmado pela observação do ciclo de multiplicação desse organismo, que possui uma característica fase de eclipse (desnudamento), além de análises do genoma completo e a partir de então, o organismo que era conhecido como “cocos de Bradford” passou a ser chamado de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV). Esse nome foi escolhido devido ao isolamento ter sido realizado em amebas da espécie *Acanthamoeba polyphaga* e devido a semelhança desses vírus com bactérias gram-positivas na coloração de Gram, como se fosse uma forma de mimetismo (*mimicking microbe*), que fez com que os pesquisadores confundissem os dois microrganismos (Raoult et al, 2007).

O APMV foi o primeiro mimivírus descoberto e representa atualmente o protótipo da família *Mimiviridae*. Seu capsídeo é formado por três camadas proteicas que revestem uma membrana interna lipídica, a qual circunda a parede do cerne (Figura 3A; 3B). O

APMV apresenta uma simetria pseudo-icosaédrica com 500 nm de diâmetro e é circundado por fibrilas com cerca de 125 nm de diâmetro, formando uma partícula com 750 nm no total, o maior vírus identificado até aquele momento (Figura 3A; 3D). Além disso, esses vírus possuem uma região em forma de estrela em um dos vértices, denominada “stargate”, que é por onde o genoma é liberado durante a fase de desnudamento (Figura 3C) (Raoult et al, 2004; Xiao et al, 2009; Abrahão et al, 2014).

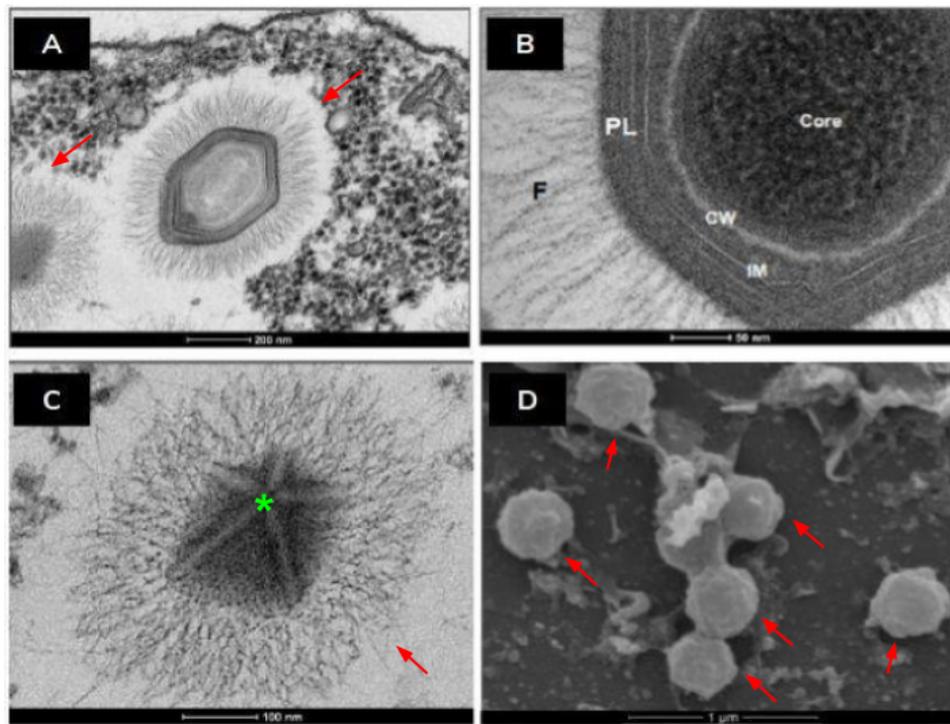


Figura 3. Partículas de Mimivírus. Imagens de um isolado de mimivírus observado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (**A**, **B** e **C**) e por Microscopia Eletrônica de Varredura (**D**). As setas vermelhas indicam as partículas virais. **A)** Observação de um capsídeo pseudo-icosaédrico, circundado por fibrilas, com três camadas proteicas e uma membrana lipídica revestindo o cerne. **Barra:** 200 nm. **B)** Maiores detalhes das estruturas que compõem a partícula dos mimivírus. **F:** Fibrilas; **PL:** Camadas proteicas; **IM:** Membrana interna; **CW:** parede do cerne. **Barra:** 50 nm. **C)** Observação da face com o “stargate” (indicado pelo asterisco verde), vértice pelo qual o genoma é liberado. **Barra:** 100 nm. **D)** Observação da morfologia externa de partículas de um isolado de mimivírus através de um microscópio eletrônico de varredura. **Barra:** 1 µm. **Fonte:** Adaptado de Abrahão *et al*, 2014 e Banco de imagens do GEPVIG.

As fibrilas que circundam o capsídeo são naturalmente resistentes a protease, porém, quando tratadas com lisozimas elas se tornam sensíveis a protease, sugerindo assim, que elas estão imersas em um matriz de uma substância muito parecida com peptidoglicano, o que explica, em parte, o fato de reterem a cor roxa durante a colocação de Gram. Estudos já demonstraram que essas fibrilas possuem um papel importante na adesão celular, apesar de sua ausência não impedir a multiplicação viral (Rodrigues et al, 2015). Em 2011, Boyer e colaboradores realizaram 150 passagens do APMV em cultura

axênica de *Acanthamoeba castellanii* resultando em uma variante denominada M4 que apresentou uma drástica redução das fibrilas, porém, o vírus mesmo assim conseguia penetrar e se multiplicar na ameba hospedeira (Boyer et al, 2011).

Como já foi citado, uma das características que chamou atenção dos pesquisadores com a descoberta do APMV foi a descrição de seu grande genoma. O genoma do APMV é composto por uma molécula de DNA linear fita dupla, com aproximadamente 1,2 megabases (Mb) que possui apenas 9,5% de DNA não codificante e mais de 1200 ORFs (do inglês “Open Reading Frame”). A partir das análises realizadas com o genoma do APMV foram encontrados genes que nunca haviam sido descritos anteriormente para outros vírus como, genes que codificam enzimas envolvidas na tradução proteica (aminoacil-tRNA sintetase), proteínas envolvidas no reparo de DNA, outras proteínas como topoisomerasas I e II, enzimas envolvidas na síntese de polissacarídeos, entre outras. Além disso, essas análises contribuíram para confirmar o agrupamentos do mimivírus aos outros NCLDVs a partir da observação de diversos genes homólogos entre esses vírus, os “*core genes*”. (Raoult et al, 2004).

1.2.2- Diversidade da família *Mimiviridae*

Desde o isolamento do APMV, a busca por novos vírus gigantes foi intensificada. Atualmente, a família *Mimiviridae* é a mais diversa e a que tem maior distribuição global quando comparada aos outros vírus gigantes. Estudos metagenômicos realizados em 2005 a partir de amostras coletadas do mar de Sargasso, região ao norte do Oceano Atlântico, revelaram que cada 1 mL de água do oceano pode conter de 10^3 a 10^5 cópias genômicas de mimivírus (Ghedini et al, 2005). Esses estudos sugeriram que muitos novos vírus ainda seriam descobertos.

Os mimivírus já foram isolados de diversas amostras ambientais, incluindo água proveniente de torres de resfriamento de ar condicionado, água de rios e lagos, águas oceânicas, esgoto, água de fontes decorativas, amostras hospitalares, lentes de contato, entre outras. Além disso, foi possível isolar membros dessa família a partir de co-cultura em amebas do gênero *Acanthamoeba* e amebas da espécie *Vermamoeba vermiformis* (La scola, 2010 ; Andrade et al, 2018; Abrahão et al, 2018).

A família *Mimiviridae* possui três linhagens e dois gêneros distintos atualmente, sendo o APMV o representante da linhagem A, inserida no gênero *Mimivirus*. A linhagem B tem como representante o Megavírus chilensis, que foi isolado a partir de amostras de

água marinha coletadas na costa chilena (Arslan et al, 2011). A linhagem C é representada pelo *Acanthamoeba polyphaga* moutouvirus, isolado a partir de uma amostra de água de uma torre de resfriamento industrial francesa (Yoosuf et al, 2012). O isolamento do Cafeteria roenbergensis vírus deu origem a um novo gênero dentro dos mimivírus a partir de análises biológicas e do sequenciamento genômico, sendo formado então o novo gênero *Cafeteriavirus* (Colson et al, 2011; Fischer et al, 2010).

Em 2013, Yutin e colaboradores analisaram uma coleção de grupos de genes ortólogos, que abrangiam genes conservados em todos os NCLDVs, e refizeram análises genômicas mais profundas com vírus que haviam sido classificados anteriormente como phycodnavírus. As árvores filogenéticas construídas suportam fortemente que os Organic Lake phycodnavírus (OLPV1 e OLPV2) e *Phaeocystis globosa* vírus (PGV) formam um grupo monofilético com os mimivírus, e são, conseqüentemente, mais próximos filogeneticamente deles do que dos phycodnavírus. Esses achados sugeriram a expansão da família *Mimiviridae* com a inclusão desses novos membros (Yutin et al, 2013).

Em 2017, o genoma de um putativo vírus, denominado Klosneuvírus, foi encontrado a partir de análises metagenômicas de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) em Klosterneuburg, na Áustria. A partir de análises genômicas e construção de árvores filogenéticas, foi proposta uma nova subfamília, provisoriamente denominada *Klosneuvirinae*, dentro da família *Mimiviridae*, que abrigaria então esse novo vírus (Schulz et al, 2017). Em 2018, foi descrito o primeiro isolado desse grupo que foi denominado Bodo saltans vírus (BsV) por infectar o cinetoplastídeo Bodo saltans (Deeg, C. M. et al, 2018). Este vírus foi isolado a partir de uma amostra de água coletada de uma lagoa temperada eutrófica no sul da Colúmbia Britânica, Canadá. Seu genoma de 1.39 Mb codifica 1227 ORFs preditas (Deeg, C. M. et al, 2018).

Além desses, vários outros mimivírus já foram isolados em diversos países (Figura 4). O primeiro mimivírus isolado no Brasil foi denominado Samba vírus (SMBV). Este vírus foi isolado a partir de amostras de água do Rio Negro, situado na floresta amazônica no estado Amazonas. Análises filogenéticas revelaram que esse vírus é agrupado com os mimivírus da linhagem A (Campos et al, 2014). Além do Samba vírus, outros mimivírus da linhagem A foram isolados no Brasil, como o Niemeyer vírus (NYMV) e o Kroon vírus (KROV), isolados a partir de amostras de água coletadas em lagoas urbanas (Boratto et al, 2015; Boratto et al, 2017).

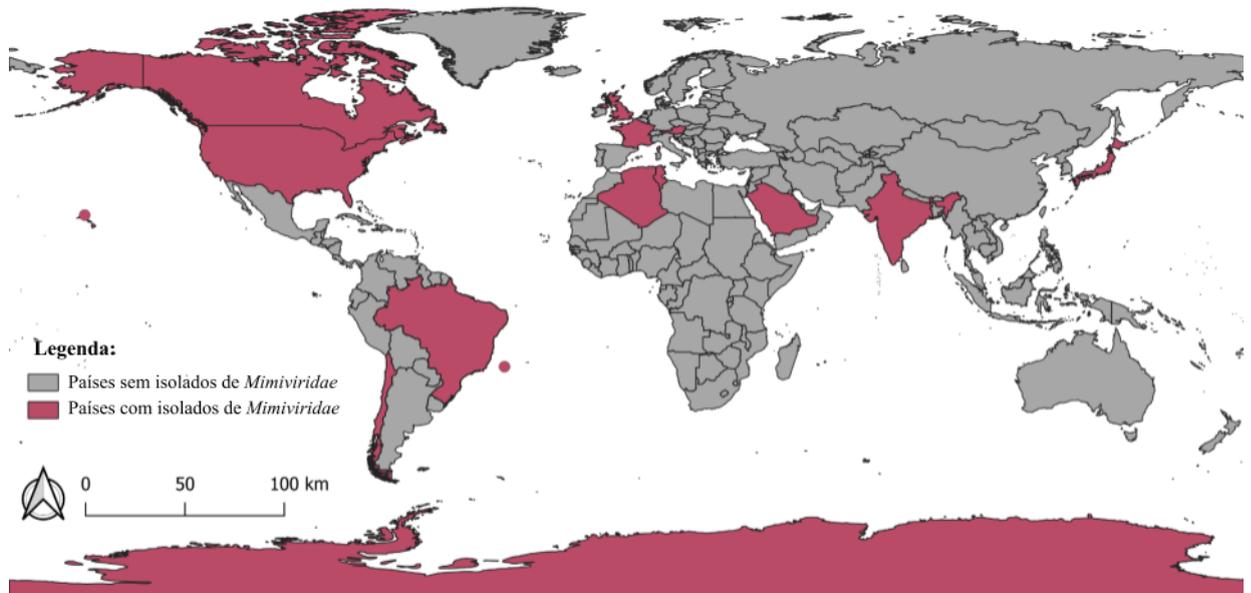


Figura 4. Mapa representativo da distribuição dos isolados da família *Mimiviridae* no mundo. Os países dos quais já foram obtidos isolados de mimivírus estão coloridos (magenta). O ponto ao lado do Brasil representa o tupanvírus isolado a partir de solo oceânico. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Um extenso estudo de prospecção foi realizado por Dornas e colaboradores em 2015, neste estudo foi obtido um total de 69 novos isolados de vírus gigantes a partir de amostras de água e solo coletadas da Lagoa da Pampulha, localizada na cidade de Belo Horizonte, Brasil. Incrivelmente, cerca de 85% desses vírus pertenciam à família *Mimiviridae*, principalmente da linhagem A (Dornas et al, 2015).

Em 2018 foi isolado pelo Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes (GEPVIG), o maior vírus gigante descrito até o momento, nomeado de Tupanvírus. A descoberta desse vírus foi um marco, devido ao seu grande tamanho (1,2 - 2,3 μm) e identificação de uma “cauda” acoplada ao capsídeo viral, uma característica nunca vista antes em vírus gigantes de amebas (Figura 5) (Abrahão et al, 2019).

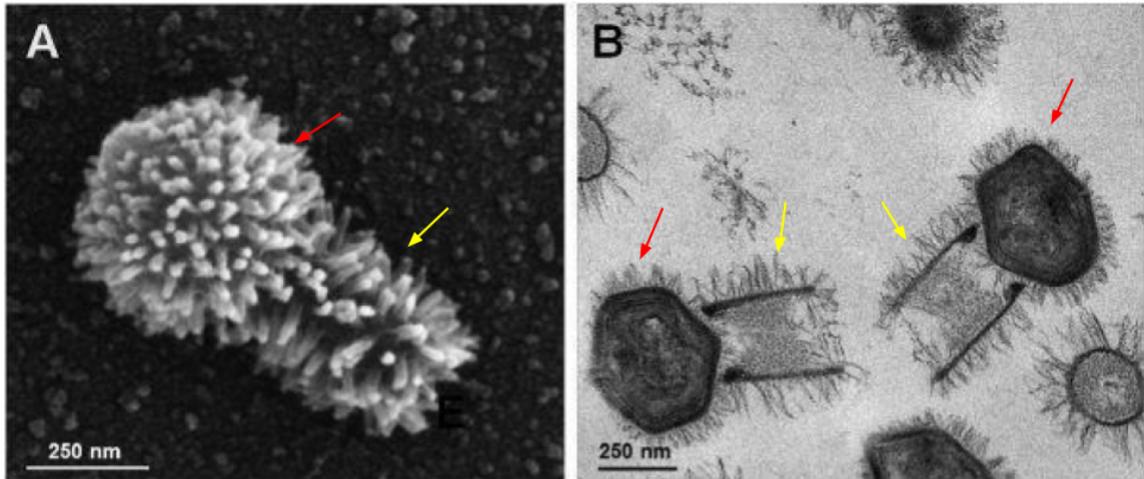


Figura 5. Partículas de Tupanvírus. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (A) e de Microscopia Eletrônica de Transmissão (B) de partículas de tupanvírus. As partículas desse vírus são compostas pelo capsídeo pseudoicosaédrico (indicado pelas setas vermelhas) acoplado a uma cauda (indicada pelas setas amarelas), ambos cobertos por fibrilas. **Fonte:** Adaptado de Rodrigues *et al*, 2019.

Dois tupanvírus foram descritos: o primeiro foi isolado a partir de amostras de sedimentos coletadas de uma lagoa salina no sul da Nhecolândia, Pantanal, Brasil e foi chamado de Tupanvírus Soda Lake. O segundo foi isolado a partir de amostras de sedimento oceânico (a partir de 3.000 metros abaixo da superfície da linha d'água) coletadas na Bacia de Campos, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e foi chamado de Tupanvírus Deep Ocean (Abrahão *et al*, 2018a).

Análises filogenéticas demonstraram que esse dois novos vírus se agruparam separadamente dos demais mimivírus, sugerindo portanto a formação de um novo gênero que seria composto pelos dois isolados de tupanvírus (Figura 6) (Abrahão *et al*, 2018a; Rodrigues *et al*, 2019).

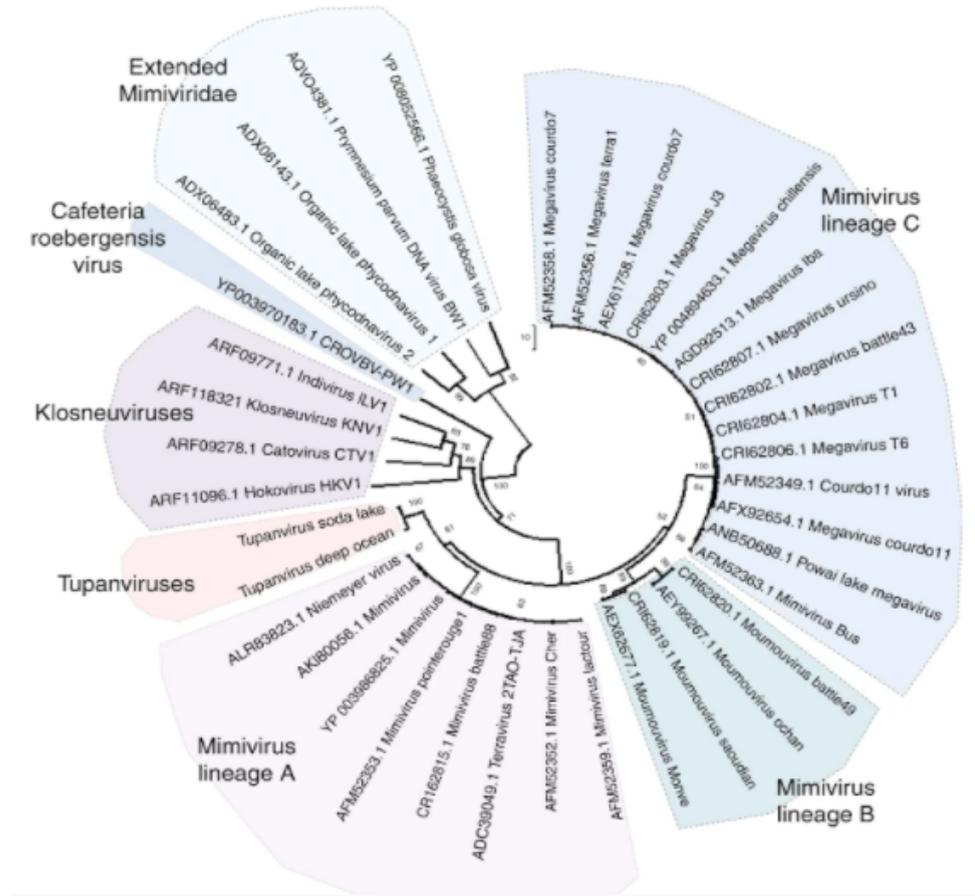


Figura 6. Árvore filogenética da família *Mimiviridae*. Árvore realizada com base em sequências de aminoácido codificadas pelo gene da DNA polimerase B. Os agrupamentos formados foram destacados com cores diferentes. O agrupamento dos tupanvírus indica a formação de um novo gênero dentro da família *Mimiviridae*. **Fonte:** Adaptada de Abrahão *et al*, 2018a.

Em 2019, Bajrai e colaboradores descreveram um novo vírus gigante isolado a partir de amostras de esgoto da Arábia Saudita. Este vírus foi isolado de uma cultura de *Vermamoeba vermiformis* e foi nomeado Yasminevírus. Seu capsídeo apresenta cerca de 330 nm de diâmetro e possui uma fina camada de fibrilas ao seu redor, semelhante aos mimivírus (Figura 7). Seu genoma é de DNA fita dupla linear com cerca de 2.1 Mb que codifica 1.541 proteínas. Esse vírus apresenta uma grande complexidade genômica, codificando uma grande quantidade de proteínas envolvidas no processo de tradução. As análises filogenéticas demonstraram que este vírus é membro da família *Mimiviridae*, e se agrupa com os klosneuvírus (Bajrai *et al*, 2019).

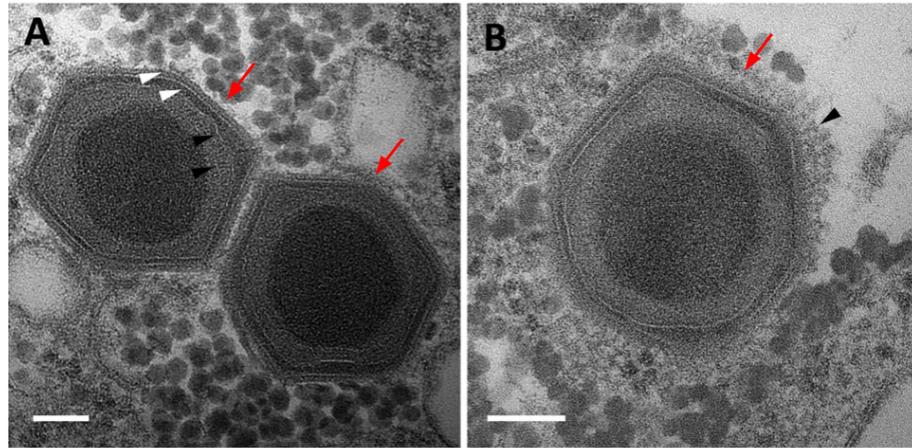


Figura 7. Partículas de yasminevírus. (A e B) Imagens obtidas a partir de MET. As partículas virais estão indicadas pelas setas vermelhas. (A) Partículas maduras de yasminevírus no citoplasma da célula hospedeira. As pontas de setas pretas indicam duas supostas membranas finas e as pontas de setas brancas indicam as duas camadas que compõem o capsídeo viral. **Barra:** 100 nm. (B) O capsídeo do yasminevírus é circundado por uma fina camada de fibrilas (ponta de seta preta). **Barra:** 100 nm. **Fonte:** Adaptado de Bajrai *et al*, 2019.

1.2.3- Ciclo de multiplicação

O APMV é multiplicado no citoplasma de células do gênero *Acanthamoeba*, apesar de haver envolvimento de alguns fatores nucleares (Mutsafi *et al*, 2010). Em 2018 foram descritos os tupanvírus, um membro da família *Mimiviridae* capaz de multiplicar tanto em amebas do gênero *Acanthamoeba* quanto em amebas da espécie *Vermamoeba vermiformis* (Abrahão *et al*, 2018). Já foi sugerido que esses vírus também infectam e se multiplicam em outros tipos celulares, como monócitos e macrófagos humanos e outras linhagens fagocitárias. Entretanto, a internalização por fagocitose é realizada via ativação do fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K), sem o envolvimento de receptores celulares específicos (Ghigo *et al*, 2008; Silva *et al*, 2013). Estudos recentes descrevem que o APMV não multiplica em PBMCs humanos (Abrahão *et al*, 2018b).

O ciclo de multiplicação dos mimivírus tem início com a penetração viral através da fagocitose por amebas *Acanthamoeba sp.* ou *Vermamoeba vermiformis*. Após a penetração, o vírus fica internalizado em vacúolos fagocíticos durante a fase inicial do ciclo. Aproximadamente duas horas pós-infecção ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo e subsequentemente a abertura do stargate. Após a abertura do stargate, ocorre a fusão da membrana viral interna com a membrana do fagolisossomo e a chamada semente viral contendo o DNA envolto por proteínas é liberada no citoplasma do hospedeiro, essa etapa corresponde ao desnudamento. A semente viral liberada dá origem a uma fábrica viral precoce. Essa fábrica viral precoce se transforma em uma fábrica viral madura, onde

ocorrem os processos de replicação do DNA, morfogênese viral e montagem das novas partículas. Entre 6 e 8 horas pós-infecção inicia-se a morfogênese viral. E menos de 12 horas pós-infecção as partículas já estão maduras e são liberadas por lise celular (Susan-Monti et al, 2007; Zauberman et al, 2008; Mutsafi et al, 2010; Abrahão et al, 2014; Andrade et al, 2017, Abrahão et al, 2018) (Figura 8) .

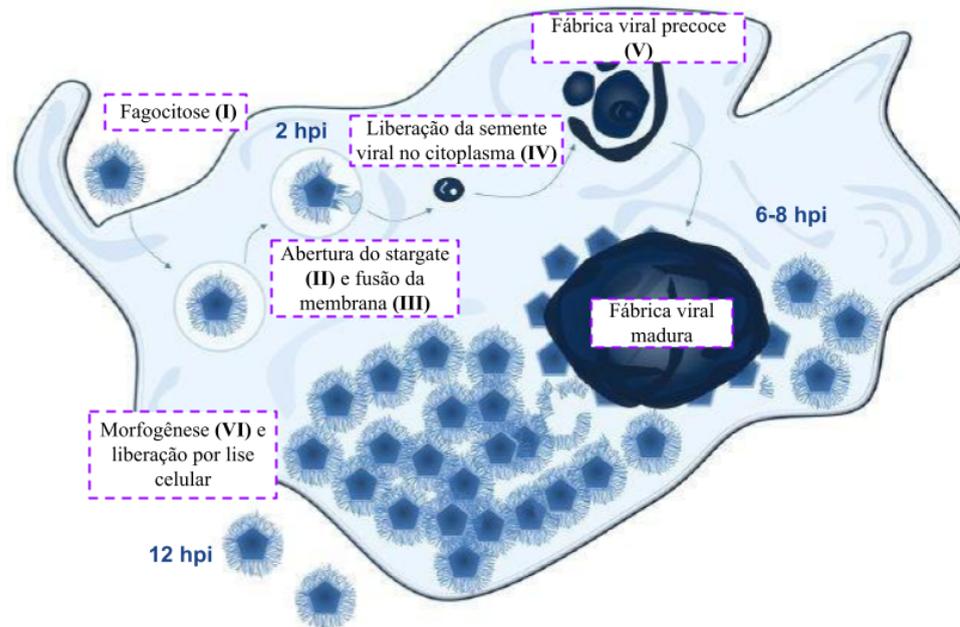


Figura 8. Imagem representativa do ciclo de multiplicação do APMV. (I) O ciclo se inicia com a penetração da partícula viral via fagocitose. (II) Após a penetração, próximo a 2 horas pós-infecção (hpi), ocorre a acidificação do fagossomo, seguido da abertura do stargate e (III) fusão da membrana viral interna com a membrana do fagolisossomo. (IV) Liberação da semente viral no citoplasma do hospedeiro. (V) Formação de uma fábrica viral precoce que, posteriormente, se transforma em uma fábrica viral madura, entre 6 e 8 hpi. (VI) É na fábrica viral madura que ocorre a replicação do genoma, morfogênese e montagem da nova progênie viral. O final do ciclo se dá com a liberação das partículas por lise celular, que já começa a acontecer antes de 12 hpi. **Fonte:** Adaptado de Abrahão *et al*, 2014.

Anteriormente, o modelo aceito para a morfogênese do APMV era o proposto por Kuznetsov e colaboradores, em 2013 (Figura 9). Nesse modelo a morfogênese tem início com a formação da face onde o stargate está localizado, seguido da organização de proteínas principais do capsídeo resultando na formação do restante do capsídeo, com exceção de um pequeno orifício na parte oposta ao stargate. O genoma é introduzido através desse orifício que, posteriormente, é vedado com proteínas. Após a formação do capsídeo, a partícula adquire uma camada proteica denominada integumento e, finalmente, recebe uma última camada contendo as fibrilas de superfície tornando as partículas maduras e prontas para a liberação (Kuznetsov et al, 2013).

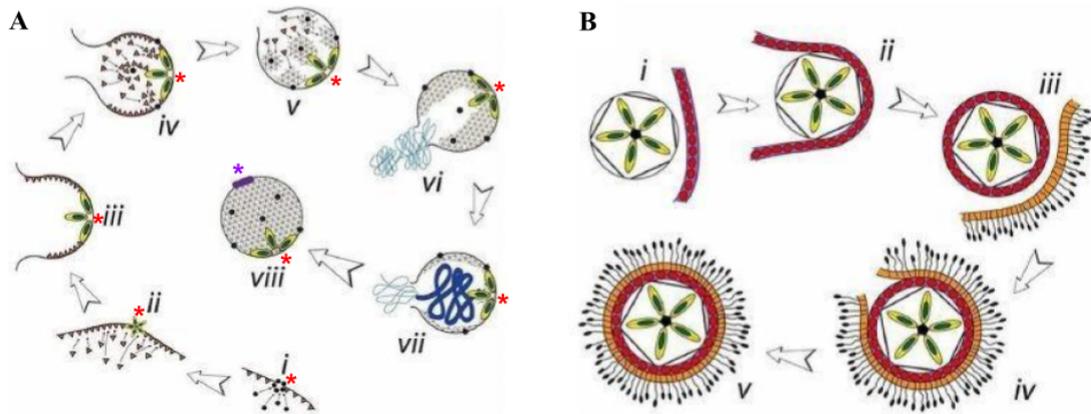


Figura 9. Modelo para a morfogênese do APMV. (A) A montagem do capsídeo inicia-se pela formação do stargate (posição indicada pelos asteriscos vermelhos) (i), seguida de uma organização das proteínas principais do capsídeo para a formação do capsídeo viral (ii - v), posteriormente o genoma (em azul) é inserido pela face oposta ao stargate (posição indicada pelo asterisco roxo) (vi - vii) e o orifício é então preenchido por proteínas (viii). (B) Após a formação do capsídeo, a partícula adquire uma membrana proteica, o integumento (representado em vermelho) (i - ii) e finalmente, uma última camada contendo as fibrilas (representado em laranja) (iii - iv) se tornando uma partícula viral madura (v). **Fonte:** Adaptado de Kuznetsov *et al*, 2013.

Uma mudança no modelo da morfogênese foi proposta por Andrade e colaboradores em 2017, sugerindo que a formação do capsídeo, empacotamento do DNA, aquisição do integumento e da camada de fibrilas não ocorriam de forma sequencial como descrito anteriormente.

Foi observado por meio de microscopia eletrônica de transmissão que a incorporação do genoma ocorre, na verdade, concomitantemente com a aquisição da camada de fibrilas (Figura 10) (Andrade *et al*, 2017).

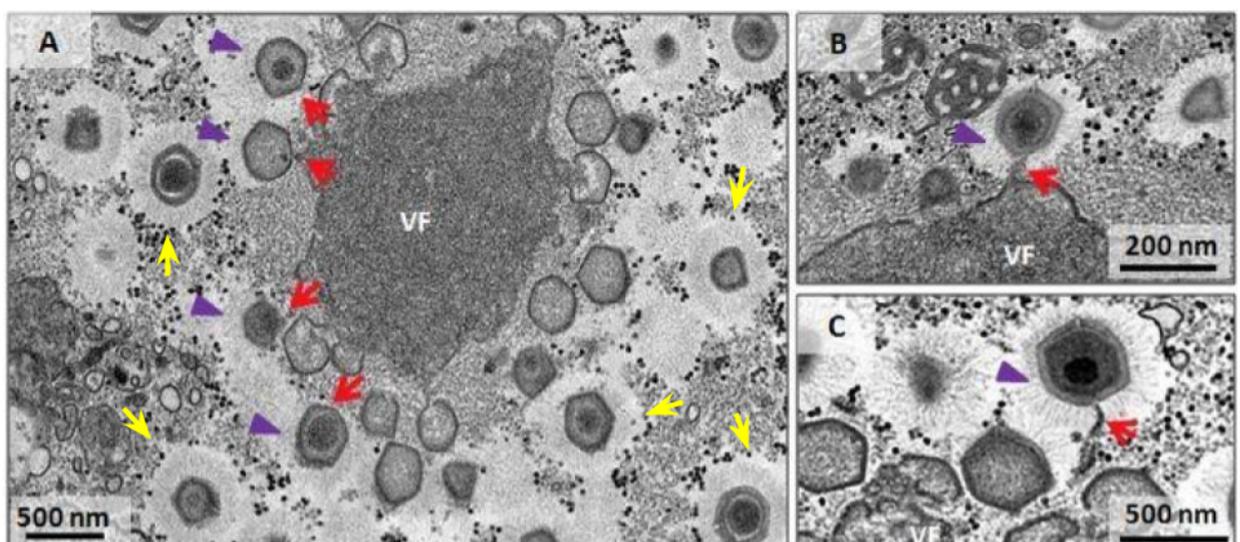


Figura 10. Modelo de incorporação do genoma e aquisição de fibrilas em mimivírus. (A, B e C) Modelo demonstrando, por MET, que a incorporação do genoma e a aquisição da camada de fibrilas podem ocorrer

concomitantemente. As setas em roxo apontam para as fibrilas sendo adquiridas na AAF e as setas vermelhas apontam para o genoma viral sendo inserido no capsídeo. É possível observar que mesmo partículas parcialmente cobertas por fibrilas já estão recebendo o genoma para ser empacotado, sugerindo as concomitâncias desses processos. As setas amarelas indicam as partículas maduras, já com o genoma incorporado e com a camada de fibrilas, prontas para serem liberadas. **VF:** Fábrica viral. **Fonte:** Adaptado de Andrade *et al*, 2017.

Além disso, os mesmos autores demonstraram que as fibrilas eram adquiridas próximas à fábrica viral, em um região que eles denominaram de área de aquisição de fibrilas (AAF ou FAA, do inglês “*Fibril Acquisition Area*”) (Figura 11) (Andrade *et al*, 2017).

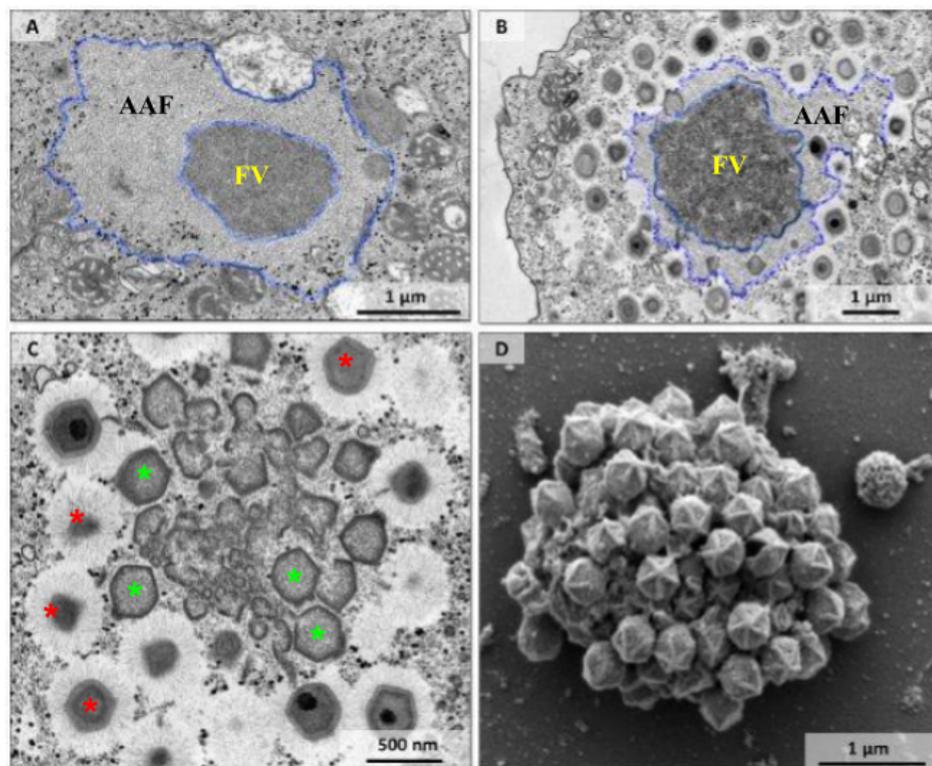


Figura 11. Presença da Área de Aquisição de Fibrilas (AAF) na periferia da fábrica viral (FV). (A - C) Imagens de MET mostrando a diminuição da AAF de uma fábrica viral madura (B) quando comparada a uma fábrica viral precoce (A), mostrando que a formação de novas partículas consomem essa área. (C) Partículas virais maduras que já passaram pela AAF (indicadas por asteriscos vermelhos) e partículas virais imaturas sem fibrilas que estão ainda no interior das fábricas virais (indicadas por asteriscos verdes). (D) Imagem de uma fábrica viral madura visualizada por MEV mostrando partículas ainda sem fibrilas, com o stargate (estrutura semelhante a uma estrela) proeminente. **Fonte:** Adaptado de Andrade *et al*, 2017.

Estes achados resultaram em algumas alterações acerca do que se conhecia até então sobre o ciclo de multiplicação dos mimivírus (Figura 12) (Andrade *et al*, 2017).

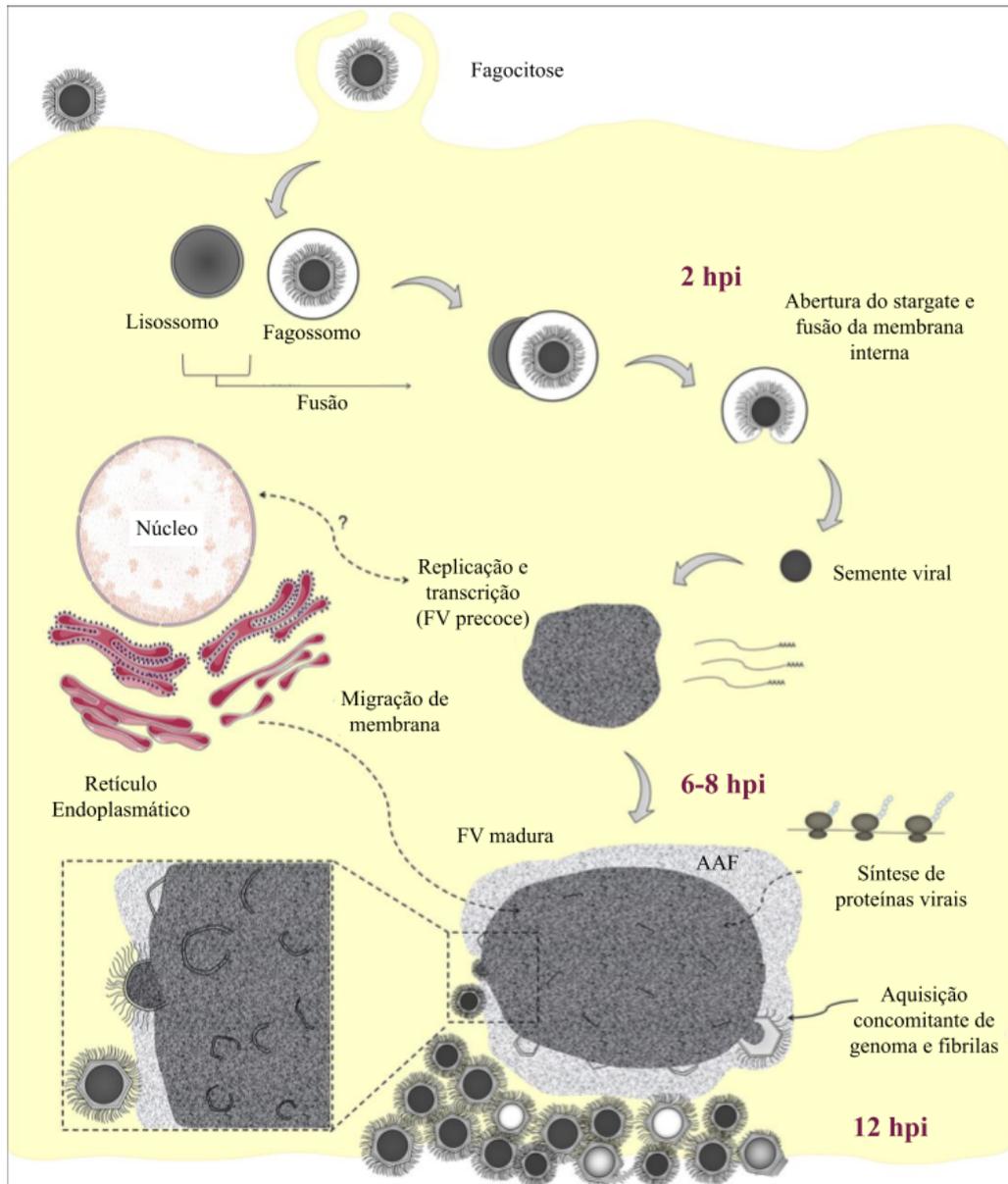


Figura 12. Modelo mais atual do ciclo de multiplicação dos mimivírus. Modelo representativo com a adição da área de aquisição de fibrilas (AAF) na periferia da fábrica viral (FV) madura. A participação do núcleo durante o ciclo dos mimivírus ainda não é clara e precisa de mais estudos. **hpi**: horas pós-infecção. **Fonte:** Adaptado de Andrade *et al*, 2017.

1.3- Família *Marseilleviridae*

1.3.1- Descoberta e principais características

Com a intensificação da prospecção em busca de novos vírus gigantes após o isolamento do APMV, um grupo de pesquisadores franceses obteve sucesso no isolamento de um novo vírus, que foi nomeado de *Marseillevirus marseillevirus* (MsV) (Boyer et al, 2009). Esse novo vírus foi isolado em amebas da espécie *Acanthamoeba polyphaga* a partir de uma amostra de água coletada de uma torre de resfriamento de ar condicionado na

cidade de Paris, França. O MsV possui um capsídeo de 250 nm de diâmetro e apresenta uma morfologia icosaédrica (Figuras 13 e 14). Apesar de possuírem fibrilas circundando o capsídeo viral, assim como descrito para os mimivírus, elas são muito menores, atingindo cerca de 12 nm de comprimento. (Boyer et al, 2009).

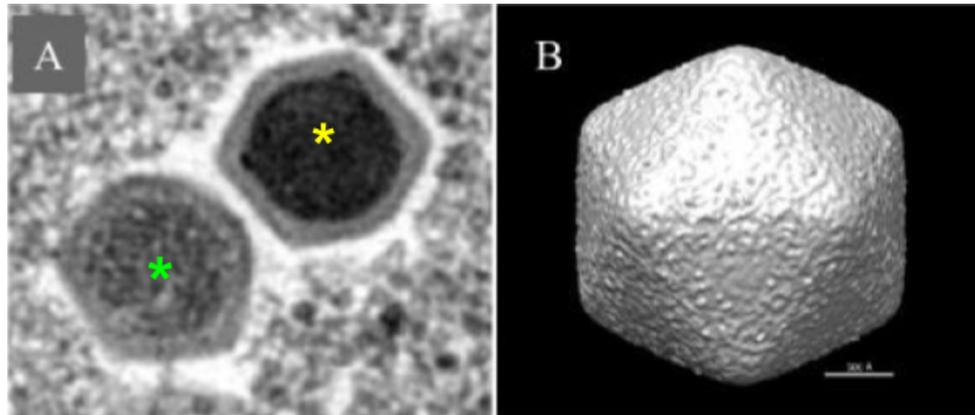


Figura 13. Partículas de Marseillevirus. (A) Imagem de partículas de MsV imaturas (indicada pelo asterisco verde) e maduras (indicada pelo asterisco amarelo) observadas sob microscópio eletrônico de transmissão. É possível observar sua morfologia icosaédrica. (B) Representação 3D de uma partícula de MsV realizada por criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-ME), Barra: 500 Å. Fonte: Adaptado de Boyer et al, 2009.

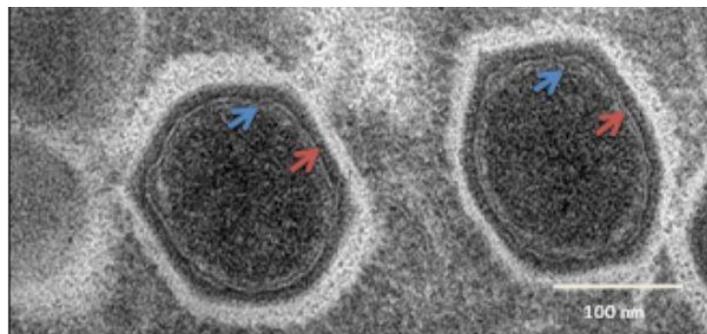


Figura 14. Detalhes da partícula dos marseillevírus. Imagens de partículas de um isolado de marseillevírus adquiridas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As setas azuis indicam a presença de uma membrana interna e as setas vermelhas indicam a presença do nucleocapsídeo. Barra: 100 nm. Fonte: Banco de imagens do GEPVIG.

O genoma do MsV é composto por uma molécula de DNA dupla fita circular, com aproximadamente 370.000 pares de bases e um conteúdo GC de 44,73%. Foram preditas 457 ORFs, sendo que 89,33% do genoma representa sequências codificadoras. Dos 41 genes que compõem o conjunto de genes ancestrais para os NCLDV, 28 são encontrados no genoma do MsV, sugerindo que esse vírus é, de fato, um membro do grupo dos NCLDV. Uma característica muito importante observada no genoma do MsV foi seu alto nível de mosaicism, uma vez que dentre as proteínas preditas para esses vírus 59, 57, 70 e

2 se mostraram altamente similares a sequências homólogas de vírus, bactérias, eucariotos e arqueias, respectivamente. Esse mosaicismos pode ser explicado pela ocorrência de transferência gênica horizontal (TGH) devido ao estilo de vida simpátrico das amebas, que são os prováveis hospedeiros desses vírus, uma vez que elas são de vida livre e capazes de fagocitar diferentes organismos, possibilitando a transferência gênica entre os diferentes grupos de organismo durante o processo de replicação do DNA viral (Boyer et al, 2009).

1.3.2- Diversidade da família *Marseilleviridae*

O isolamento do MsV deu origem a uma nova família viral, denominada *Marseilleviridae*, que atualmente é reconhecida pelo ICTV, sendo o MsV o protótipo do gênero *Marseillevirus*. Nos anos posteriores, novos vírus dessa família foram isolados. O segundo membro da família foi chamado de Lausannevírus e foi isolado em *Acanthamoeba castellanii* a partir de uma amostra de água coletada em um rio próximo a cidade de Paris, na França (Thomas et al, 2011). O isolamento desse novo vírus começou a fragmentar a família em linhagens, sendo o MsV o representante da linhagem A e o Lausannevírus o representante da linhagem B. Esse vírus possui um capsídeo de 190-220 nm de diâmetro sem fibrilas, e um genoma com mais de 340.000 pares de bases (Thomas et al, 2011). Alguns anos mais tarde uma terceira linhagem foi incluída na família *Marseilleviridae*, o primeiro representante da linhagem C foi o Tunisvírus, isolado a partir de uma amostra de água coletada de uma fonte decorativa presente na cidade de Tunis, na Tunísia (Aherfi et al, 2014). Esse vírus possui características morfológicas semelhantes ao MsV, porém seu genoma possui aproximadamente 380.000 pares de bases (Aherfi et al, 2014). Finalmente, em 2016 foi incluída a quarta linhagem dos marseillevírus, a linhagem D é representada pelo Brazilian marseillevírus (BrMsV), o primeiro marseillevírus isolado no Brasil. Esse vírus foi isolado a partir de uma amostra de água coletada na Lagoa da Pampulha, na cidade de Belo Horizonte, Brasil e também é morfológicamente semelhante ao protótipo da família, porém seu genoma possui aproximadamente 360.000 pares de bases (Dornas et al, 2016). A distinção das quatro linhagens dentro da família *Marseilleviridae* foi possível através de análises filogenéticas baseadas em genes como os que codificam para a família da DNA polimerase B, Helicase VV-A18, família ATPase D5 e fatores de transcrição da proteína principal do capsídeo.

Além dos primeiros representantes de cada linhagem, diversos outros Marseillevírus foram descritos, alguns exemplos são: o Cannes 8 vírus, isolado a partir de uma amostra de

água obtida de uma torre de resfriamento na França; o Melbournevírus, isolado de amostra de água de um rio na Austrália; o Port-Miou vírus, que foi isolado a partir de uma amostra de água salobra obtida de uma nascente submarina presente no calanque Port-Miou, em Cassis na França; o Insectomime vírus, isolado a partir de órgãos internos de larvas do díptero *Eritalis tenax* obtidas em um reservatório de água na Tunísia; o Golden marseillevírus, isolado no Brasil a partir de água coletada do interior de conchas do mexilhão dourado e o Tokyovírus, isolado a partir de uma amostra de água/solo coletada do Rio Arakawa, localizado na área oriental de Tóquio, Japão (Aherfi et al., 2013; Doutre et al., 2014; Doutre et al., 2015; Boughalmi M. et al., 2013; Dos santos et al., 2016; Takemura, 2016). Além de amostras ambientais, esses vírus também já foram detectados por dados metagenômicos em amostras clínicas, como o Senegalvírus que foi detectado em amostra de fezes de um jovem senegalês sem sintomas prévios e o Giant blood marseillevírus (GBM) que foi detectado em frações de soro coletados de doadores de sangue saudáveis na França (Lagier et al., 2012; Popgeorgiev et al., 2013).

Nesses últimos 12 anos, diversos marseillevírus foram isolados de diferentes amostras ambientais e em vários países do mundo (Figura 15), tornando a família *Marseilleviridae* a segunda maior em número de isolados dentre os grupos de vírus de amebas conhecidos atualmente.

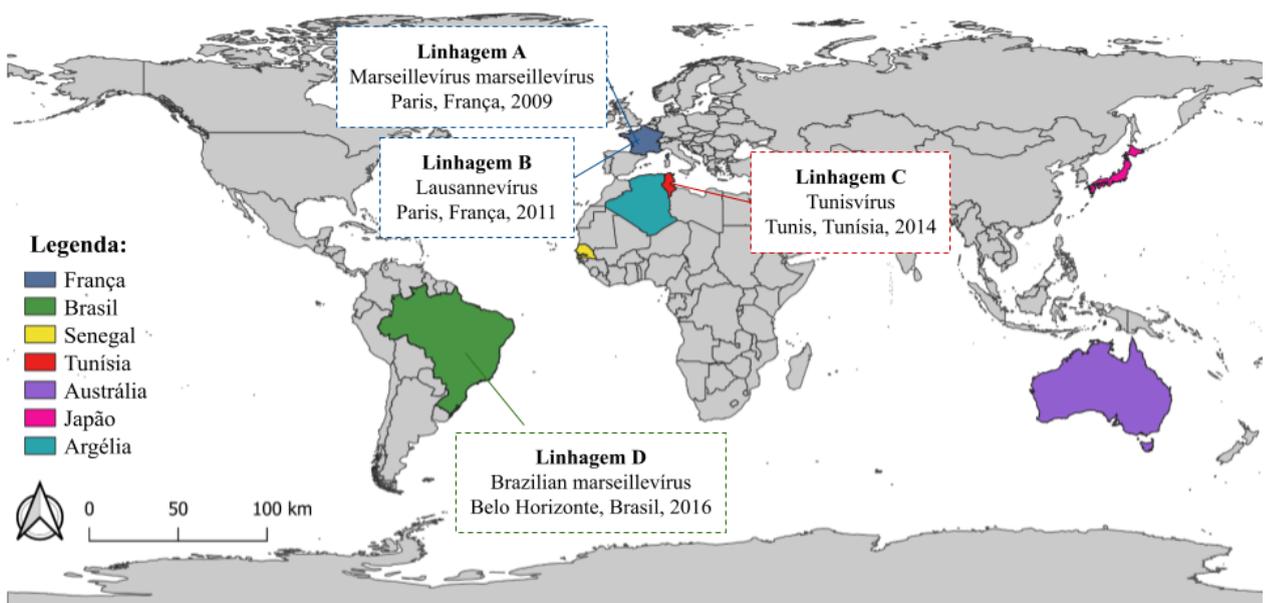


Figura 15. Mapa dos isolados de marseillevírus no mundo. Mapa representativo indicando os países nos quais foram isolados representantes da família *Marseilleviridae*. Em destaque (caixinhas coloridas) estão os primeiros isolados de cada linhagem (A, B, C e D). **Fonte:** Elaborado pela autora.

1.3.3- Ciclo de multiplicação

Assim como já havia sido observado para os mimivírus, os marseillevírus também se multiplicam no citoplasma de seus hospedeiros. Porém, um importante questionamento acerca do ciclo de multiplicação dos marseillevírus era a via de penetração utilizada por essa família viral, uma vez que a via fagocítica é estimulada pela presença de partículas com dimensões acima de 500 nm (Weisman e Korn, 1967). Essa dimensão não era um problema para as partículas de mimivírus, mas era um obstáculo para as partículas de MsV. Atualmente o ciclo de multiplicação do vírus pertencentes à família *Marseilleviridae* é melhor compreendido, apesar de ainda existirem algumas lacunas.

O ciclo se inicia com a penetração viral, que pode ser por três vias diferentes: endocitose da partícula isolada (Figura 16A), fagocitose de vesículas gigantes (Figura 16B) ou fagocitose de partículas agrupadas (Figura 16C).

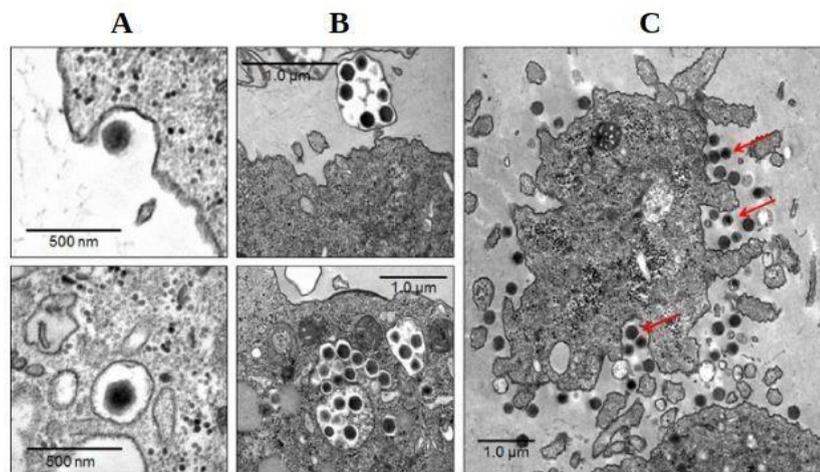


Figura 16. Vias de penetração para os marseillevírus. Imagens de MET demonstrando as diferentes vias de penetração utilizadas pelos marseillevírus. **(A)** Via endocítica utilizada por partículas isoladas. **(B)** Via fagocítica utilizada por vesículas gigantes. **(C)** Via fagocítica utilizada pelo aglomerado de partículas virais. As setas vermelhas indicam as partículas virais. **Fonte:** Adaptado de Arantes *et al*, 2016.

A penetração por macropinocitose ainda não foi muito bem estudada até o momento. Cerca de 3 a 4 horas pós-infecção as fábricas virais começam a ser observadas ocupando de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ do citoplasma do hospedeiro e são rodeadas por uma área rica em membranas (MRA - do inglês “membrane rich area”) (Figura 17). São nas fábricas virais que acontecem os processos de replicação do DNA e morfogênese viral, e ambos ocorrem de forma simultânea.

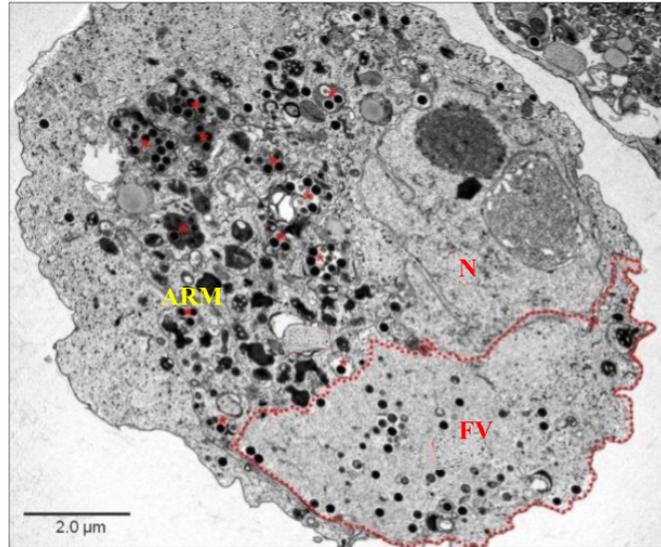


Figura 17. Ameba infectada por Marseillevirus. Imagem de MET em que é possível observar a fábrica viral ocupando grande parte do citoplasma hospedeiro (delimitada pela linha vermelha pontilhada) rodeada por membranas e vesículas (asteriscos vermelhos). **FV:** Fábrica viral. **N:** Núcleo. **ARM:** Área rica em membranas. **Fonte:** Adaptado de Arantes *et al*, 2016.

Após a montagem, a nova progênie sai da fábrica viral como partículas maduras e grande parte dessas partículas se agrupam em vesículas. A progênie é então liberada através da lise celular (Boyer *et al*, 2009; Arantes *et al*, 2016) (Figura 18).

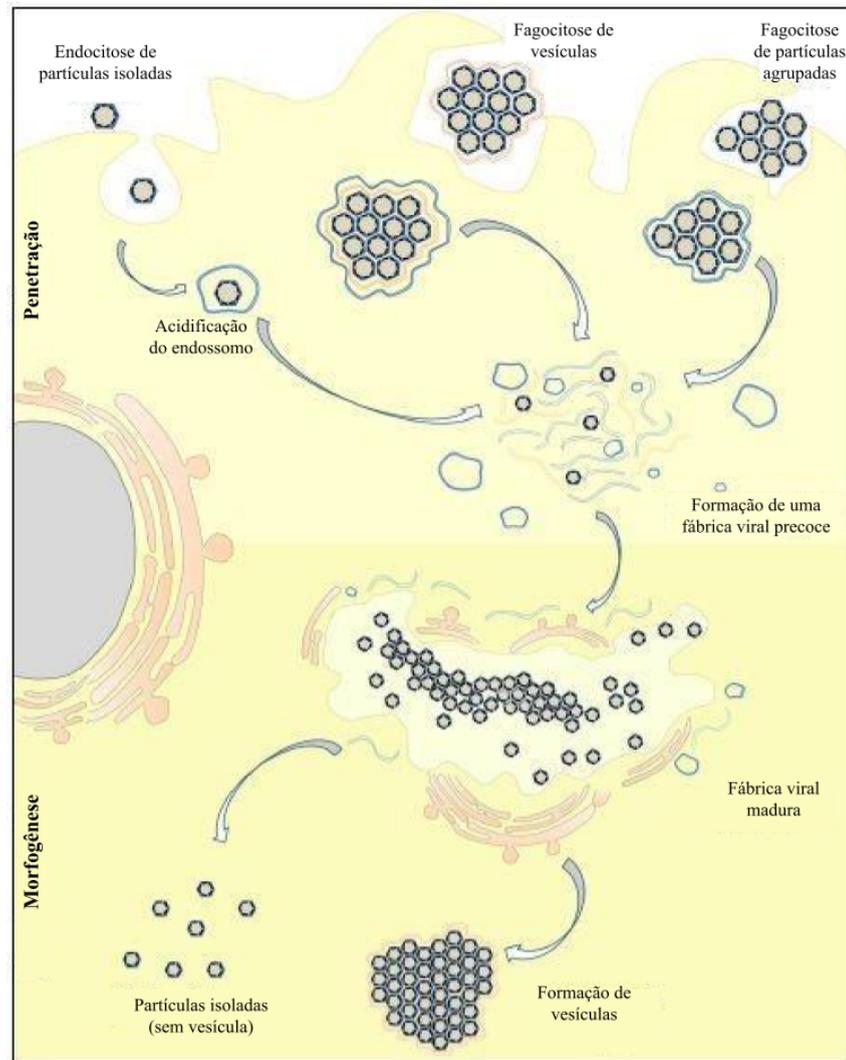


Figura 18. Esquema representativo do ciclo de multiplicação dos marseillevírus. O esquema mostra as três formas possíveis de penetração para os marseillevírus. As partículas podem ser liberadas isoladas ou agrupadas dentro de vesículas. **Fonte:** Adaptado de Arantes *et al*, 2016.

1.4- Pandoravírus

1.4.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo

O grupo dos pandoravírus teve início com a descoberta em 2013 do Pandoravírus salinus, isolado a partir de amostras de sedimento marinho no Chile e do Pandoravírus dulcis, isolado de uma amostra de lama de água doce em Melbourne, Austrália, ambos isolados de *Acanthamoeba* (Philippe et al, 2013).

Os pandoravírus possuem uma partícula ovóide medindo cerca de 1 µm de comprimento e apresentam um ostíolo apical (Figura 19).

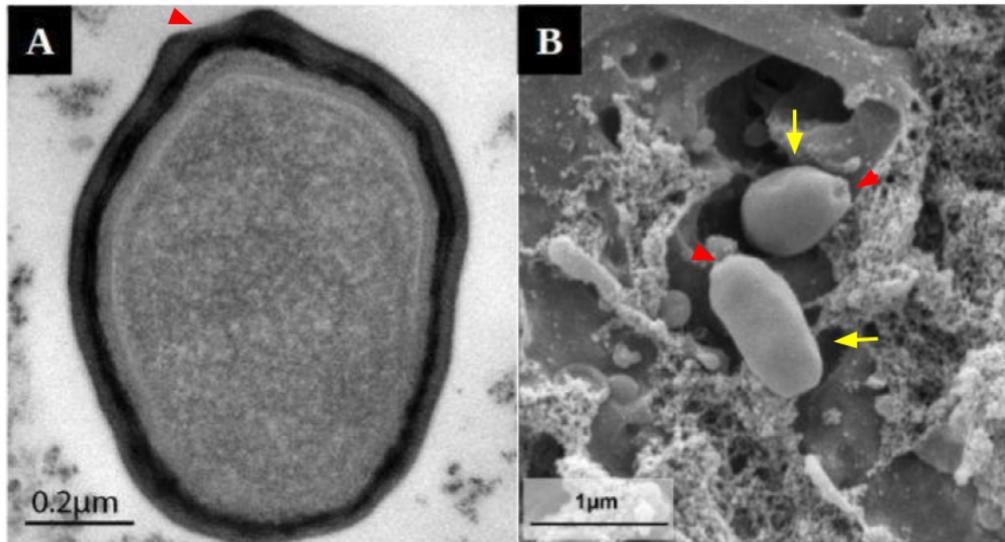


Figura 19. Partículas de pandoravírus. Os pandoravírus possuem uma partícula ovóide com cerca de 1 μm . **(A)** Imagem de MET de uma partícula de pandoravírus. A seta vermelha indica a posição do ostíolo apical. **(B)** Imagem de MEV com duas partículas evidentes (indicadas pelas setas amarelas) no meio de restos celulares. A seta vermelha indica a posição do ostíolo apical. **Fonte:** Adaptado de Philippe *et al*, 2013 e Andrade *et al*, 2018.

Em 2015 mais dois novos isolados foram descritos, o Pandoravírus inopinatum foi isolado na Alemanha a partir de amostras de um paciente com ceratite e o primeiro pandoravírus isolado no Brasil, posteriormente chamado de Pandoravírus massiliensis, foi obtido a partir de amostras da lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Brasil. (Antwerpen *et al*, 2015; Dornas *et al*, 2015; Aherfi *et al*, 2018)

Mais dois pandoravírus foram descritos em um grande estudo de prospecção realizado no Brasil por Andrade e colaboradores em 2018, nomeados posteriormente de Pandoravírus pampulha e Pandoravírus tropicalis esses vírus foram isolados, respectivamente, a partir de amostras dos córregos Mergulhão e Bom Jesus da lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Brasil (Andrade *et al*, 2018, Aherfi *et al*, 2018, Andrade *et al*, 2018). Andrade e colaboradores também descreveram o isolamento do Pandoravírus kadiweu, isolado no Brasil, a partir de amostra de água proveniente de Bonito, Mato Grosso do Sul (Andrade *et al*, 2018).

Ainda em 2018 vários outros pandoravírus foram descritos. Aherfi e colaboradores publicaram um trabalho nomeando dois pandoravírus já citados (Pandoravírus massiliensis e Pandoravírus pampulha) além de um novo pandoravírus, denominado Pandoravírus brasiliensis, que foi isolado a partir de uma amostra brasileira (Aherfi *et al*, 2018). Legendre e colaboradores descreveram mais três novos isolados: Pandoravírus quercus, Pandoravírus neocaledonia e Pandoravírus macleodensis. O primeiro foi isolado de solo coletado em Marseille, França; o segundo foi isolado a partir de uma amostra de água

salobra de um mangue próximo ao aeroporto de Noumea, em Nova Caledônia; e o terceiro foi isolado a partir de uma amostra de água doce de uma lagoa perto de Melbourne, na Austrália (Legendre et al, 2018).

Em 2019 foi descrito o Pandoravírus celtis, isolado a partir de uma amostra de solo da base de uma árvore, coletado em Marseille, na França (Legendre et al, 2019). E no mesmo ano foram descritos dois novos isolados de pandoravírus nomeados de Pandoravírus hades e Pandoravírus persephone, ambos isolados a partir de uma amostra de solo coletada na margem do rio Arakawa no Japão (Akashi, M. and Takemura, M., 2019).

A composição do capsídeo desses vírus ainda é pouco conhecida, uma vez que eles não possuem genes que codificam as proteínas do capsídeo. Porém, em 2019 Belhaouari e colaboradores fizeram análises da ultraestrutura do tegumento que circunda o capsídeo do pandoravírus massilienses e detectaram uma estrutura semelhante à da celulose. As análises mostraram que ao contrário dos outros vírus gigantes, a transcrição para o gene da síntese de celulose presente no genoma das amebas continua ao longo da fase de formação das partículas de pandoravírus, sugerindo que estes vírus desviam a maquinaria celular para benefício próprio (Belhaouari et al. 2019).

Os vírus deste grupo apresentam um genoma complexo e incrivelmente grande, indo de 1,9 a 2,8 Mb codificando de 900 a mais de 2500 proteínas, e outro aspecto que chama atenção é o fato do genoma dos pandoravírus ser mais de 90% composto por ORFans (Philippe et al, 2013). A partir de alguns estudos (Aherfi et al., 2018; Legendre et al., 2018) foi observado que os pandoravírus apresentam um grande pan-genoma aberto, demonstrando que é bem provável que existam muitos vírus desse grupo na natureza que ainda não foram descobertos e o isolamento de novos membros se faz importante para nos trazer mais informações sobre este grupo.

1.4.2- Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos pandoravírus se inicia com a fagocitose das partículas por amebas hospedeiras (Figura 20A), uma vez que seu tamanho é capaz de induzir a via fagocítica (Legendre et al., 2018; Andrade et al., 2018). Após a penetração, as partículas são mantidas no citoplasma celular dentro de fagossomos que, posteriormente, se fundem à estruturas parecidas com lisossomos e, este processo, aparentemente induz a fusão da membrana interna viral com a membrana do fagolisossomo desencadeando o desnudamento viral e iniciando a fase de eclipse, na qual o genoma do vírus é liberado no citoplasma da

célula hospedeira (Figura 20B) (Legendre et al., 2018; Andrade et al., 2018). Após o desnudamento foi possível observar a formação de fábricas virais elétron-lucentes, onde ocorre os processos de replicação, morfogênese e montagem da nova progênie (Figura 20C). A morfogênese acontece a partir de estruturas elétron-densas semicirculares, chamadas de crescentes (Figura 20D), que vão se espessando e aumentando de tamanho ao longo do ciclo, ao mesmo tempo que o conteúdo interno da partícula vai sendo preenchido até o fechamento da partícula (Andrade et al., 2018). Foi visto que essa montagem pode ser iniciada a partir da região apical (Figura 20E) ou oposta ao ostíolo (Figura 20F) (Andrade et al., 2018). Ao final do ciclo a maior parte da nova progênie é liberada por lise celular. Porém, foi comprovado que as partículas de pandoravírus também podem ser liberadas por exocitose (Andrade et al., 2018).

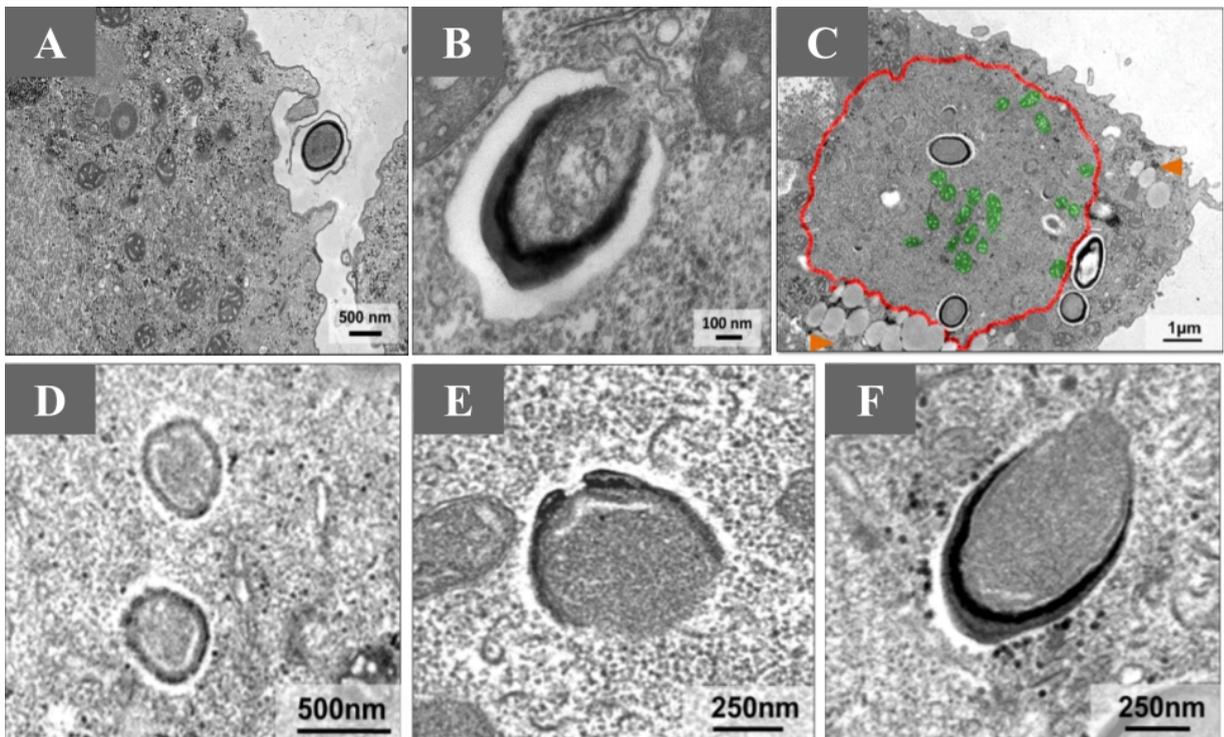


Figura 20. Ciclo de multiplicação dos pandoravírus observado por imagens de MET. (A) As partículas de pandoravírus iniciam seu ciclo a partir da penetração por fagocitose. **Barra:** 500 nm. (B) Fase de desnudamento: fusão da membrana interna da partícula com a membrana do fagolisossomo e liberação do genoma viral no citoplasma do hospedeiro. **Barra:** 100 nm. (C) Formação de uma fábrica viral elétron-lucente (destacada em vermelho) que ocupa cerca de 1/3 do citoplasma celular. As mitocôndrias estão destacadas em verde, enquanto os lisossomos são indicados pelas setas laranjas. **Barra:** 1µm. (D) Estruturas elétron-densas, denominadas crescentes, que formam o capsídeo viral. **Barra:** 500 nm. (E) Morfogênese da partícula iniciada pela parte apical com o ostíolo. **Barra:** 250 nm. (F) Morfologia da partícula iniciada pela base, parte oposta ao ostíolo. **Barra:** 250 nm. **Fonte:** Adaptado de Andrade *et al*, 2018.

1.5- Pithovirus

1.5.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo

Em 2014, Legendre e colaboradores isolaram um novo grupo de vírus gigantes em *Acanthamoeba* que foi denominado Pithovirus. O Pithovirus sibericum foi isolado na Sibéria a partir de amostras de *permafrost* datado de 30.000 anos (Legendre et al, 2014). O segundo pithovirus foi isolado a partir de amostras de esgoto coletadas na cidade de La Ciotat, na França e foi denominado Pithovirus massiliensis (Levasseur et al, 2016). Até o momento, foram descritos apenas esses dois isolados para este grupo.

Os pithovirus são morfologicamente semelhantes aos pandoravirus, porém, além de apresentarem partículas maiores, com cerca de 1,5 μm , uma cobertura do poro apical (ou cork) dos pithovirus é composto por estrias verticais paralelas (Figura 21). Se comparado ao grande tamanho de sua partícula, o genoma é relativamente pequeno, composto por DNA fita dupla circular com aproximadamente 610 kpb codificando cerca de 467 proteínas (Legendre et al, 2014).

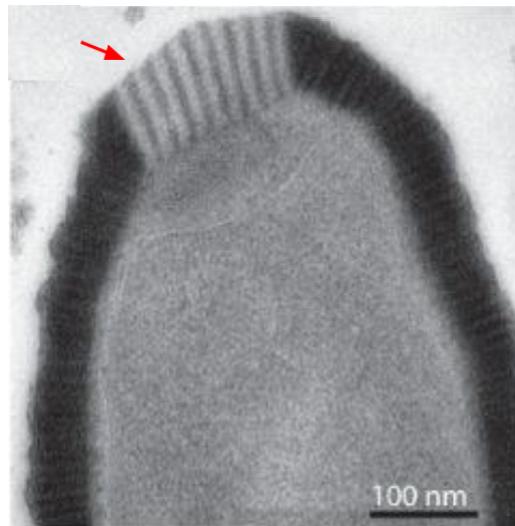


Figura 21. Partícula de Pithovirus. Imagem de uma partícula de pithovirus observada por MET. Tanto o capsídeo quanto seu poro apical (posição indicada pela seta vermelha) são compostos por estrias paralelas. **Barra:** 100 nm. **Fonte:** Adaptada de Legendre *et al*, 2014.

1.5.2- Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos pithovirus ainda não foi muito bem estudado, mas ao que se sabe até o momento seu ciclo é bem parecido com o ciclo descrito para os pandoravirus (Legendre et al, 2014). O ciclo se inicia com a penetração das partículas virais por fagocitose,

permanecendo por um tempo dentro de fagossomos no citoplasma celular. Posteriormente, a partícula perde as estrias presentes no seu poro apical, permitindo assim, que a membrana interna da partícula se funda com a membrana do fagossomo, liberando o genoma viral no citoplasma do hospedeiro (Figura 22A). De 4 a 6 horas pós-infecção já é possível observar a formação de fábricas virais elétron-luscentes no citoplasma, que é onde ocorre a replicação, morfogênese e montagem das novas partículas (Figura 22B). A formação do capsídeo e o preenchimento do conteúdo é feito de forma concomitante (Figura 22C). Primeiramente são formadas estruturas retangulares já com o cork aparente (Figura 22D), posteriormente essa estrutura assume um formato mais oval e sua camada externa fica um pouco espessa (Figura 22E), finalmente, o tegumento estriado mais externo é construído subsequentemente e por partes (Figura 22F). De 6 a 8 horas pós-infecção já são observadas partículas em diferentes estágios dentro da mesma fábrica viral. Durante a morfogênese foram observadas estruturas globulares se acumulando na periferia de alguns vírions (Figura 22G). Além disso, foram observadas também estruturas elétron-densas sem forma definida e sem composição conhecida próximas às fábricas virais (Figura 22H). Porém, elas se assemelhavam com pedaços do envelope estriado presente nestes vírus (Figura 22I), sugerindo que poderiam ser “blocos de construção” para os novos vírions. Ao final do ciclo, a nova progênie viral é liberada principalmente por lise celular. Porém, os pesquisadores observaram que as partículas maduras são encontradas em quantidades iguais tanto livres no citoplasma quanto no interior de vacúolos, sugerindo que elas podem ser liberadas também por exocitose (Legendre et al, 2014).

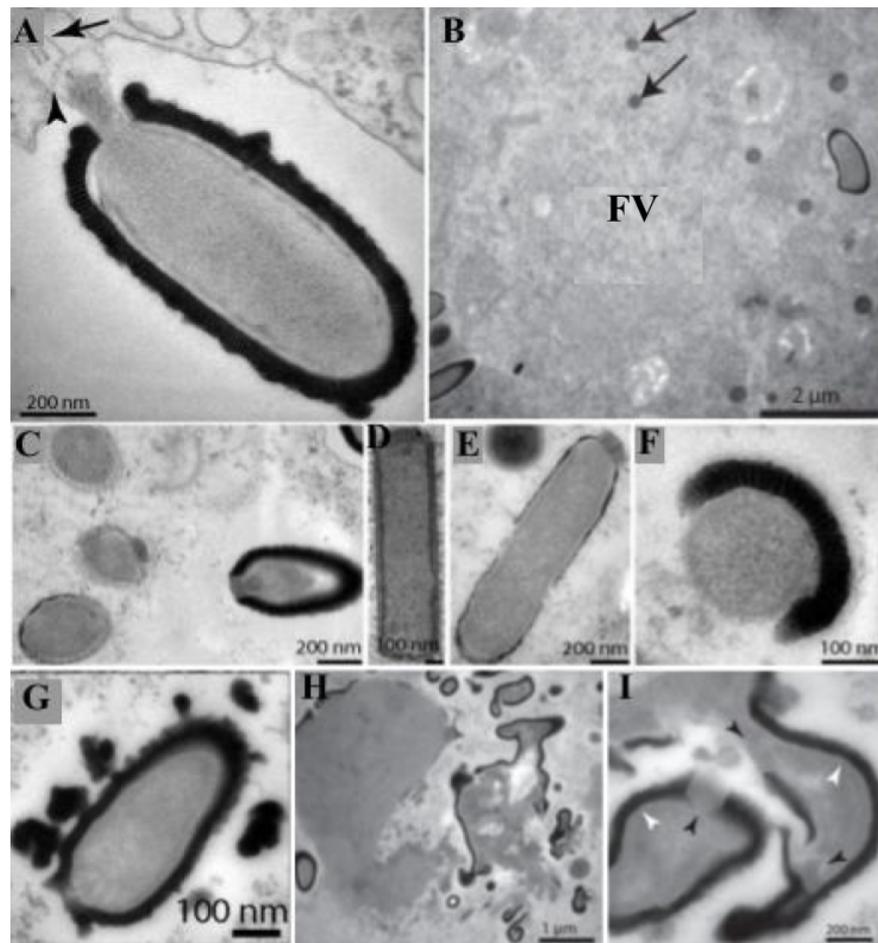


Figura 22. Ciclo de multiplicação dos pithovírus observado por imagens de MET. (A) Partícula de pithovírus perdendo seu *cork* e fundindo a sua membrana interna com a membrana do fagossomo, liberando o genoma no citoplasma do hospedeiro. **Barra:** 200 nm. **(B)** Fábrica viral (**FV**) elétron-luscente no citoplasma celular. As setas pretas indicam vesículas densas que se acumulam na periferia da fábrica viral. **Barra:** 2 µm. **(C)** Morfogênese concomitante do capsídeo e do conteúdo interno das partículas. **Barra:** 200 nm. **(D)** Partículas em formato retangular, já é possível ver a formação do *cork*. **Barra:** 100 nm. **(E)** Partículas assumindo o formato oval e espessamento da camada externa. **Barra:** 200 nm. **(F)** Partícula adquirindo seu envelope estriado espesso. **Barra:** 100 nm. **(G)** Estruturas globulares que se acumulam na periferia de alguns vírions. **Barra:** 100 nm. **(H)** Estruturas elétron-densas sem formato definido e de composição desconhecida. **Barra:** 1 µm. **(I)** Vista ampliada das estruturas mostradas em H que parecem ser compostas por envelopes estriados (pontas de flechas brancas), pedaços de *cork* (pontas de flechas pretas) e um material difuso que lembra o interior de partículas maduras. **Barra:** 200 nm. **Fonte:** Adaptado de Legendre et al, 2014.

1.6- Cedratvírus

1.6.1- Descoberta, principais características e diversidade do grupo

O primeiro cedratvírus descrito em 2016, denominado Cedratvírus A11, foi isolado em *Acanthamoeba castellanii* a partir de amostras coletadas em quatro regiões da Argélia. O novo vírus possui de 1-1,2 µm de comprimento e 0,5 µm de largura. A partícula apresenta um formato oval, seu capsídeo é estriado e possui dois poros apicais (Figura 23). Assim como já havia sido descrito para os marseillévirus, o genoma dos cedratvírus

também é composto por uma molécula de DNA fita dupla circular porém, muito maior, com aproximadamente 590.000 pares de bases e conteúdo GC de 42,6%. Foram preditos 574 genes, sendo que 177 destes (30,8%) foram definidos como ORFans (Andreani et al, 2016).

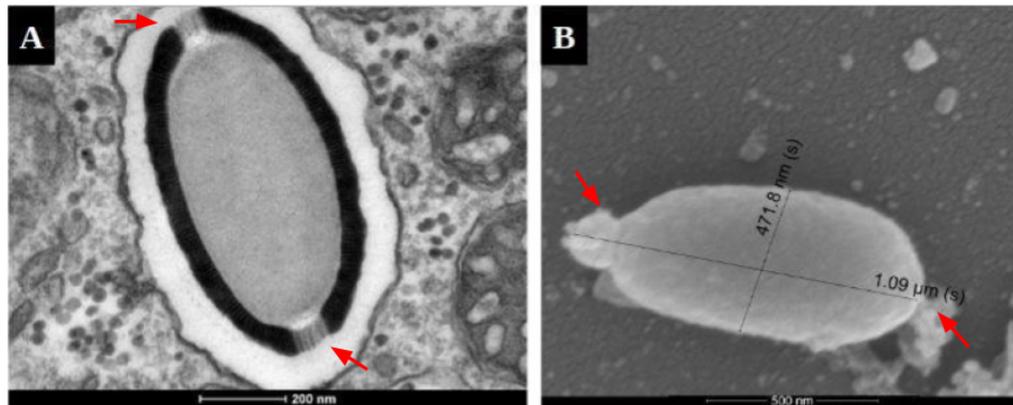


Figura 23. Partículas de Cedratvírus. Imagens de um representante dos cedratvírus adquiridas por MET **(A)** e MEV **(B)**. **(A)** Morfologia interna de uma partícula de cedratvírus. As partículas apresentam um formato ovóide e possuem dois poros apicais (indicados pelas setas vermelhas). **Barra:** 200 nm. **(B)** Morfologia externa da partícula. As posições dos poros apicais são indicadas pelas setas vermelhas. **Barra:** 500 nm. **Fonte:** Banco de imagens do GEPVIG.

Em 2017 foi isolado o segundo cedratvírus, denominado *Cedratvirus laussanensis*. Esse vírus foi isolado a partir de amostras de água coletadas da comuna francesa de Morsang-sur-Seine. O novo isolado possui cerca de 0,75-1 μm de comprimento e de 0,4 a 0,6 μm de largura. Apresenta um genoma um pouco menor que o genoma do Cedratvírus A11, com 575.000 pares de bases que codifica 643 proteínas preditas (Bertelli et al, 2017).

Ainda em 2017, foi isolado também o terceiro cedratvírus, sendo o primeiro isolado no Brasil. Este foi denominado *Cedratvirus getuliensis*, isolado em *A. castellanii* a partir de amostras de esgoto doméstico coletadas na cidade de Itaúna, MG, Brasil. Possuem aproximadamente 1 μm de comprimento e 0,5 μm de largura, dimensões muito parecidas com a do primeiro isolado (Silva et al, 2018).

Com o isolamento de *Cedratvirus getuliensis* foi demonstrado mais detalhes do capsídeo viral. Além do capsídeo ser tipicamente estriado, foi observada a presença de uma membrana que delimita um compartimento interno (Figura 24) (Silva et al, 2018).

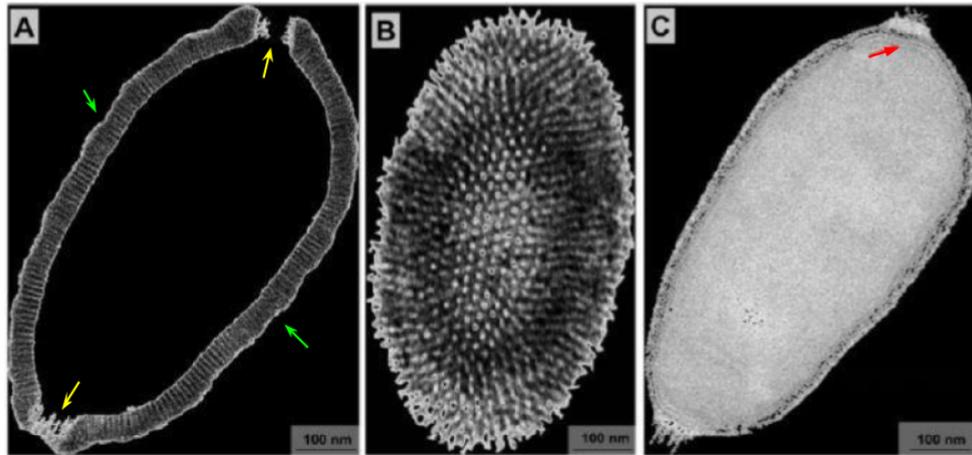


Figura 24. Características do capsídeo dos cedratvírus. (A) Capsídeo estriado (indicado pelas setas verdes) com dois poros apicais (indicados pelas setas amarelas). **Barra:** 100 nm (B) Listras paralelas do capsídeo se apresentam como pontos de forma organizada. **Barra:** 100 nm (C) O capsídeo apresenta uma membrana (indicada pela seta vermelha) que delimita um compartimento interno. **Barra:** 100 nm. **Fonte:** Adaptado de Silva *et al*, 2018.

Os quarto e quinto cedratvírus foram isolados em 2018 e foram denominados Cedratvírus zaza e Brazilian cedratvírus. O Cedratvírus zaza foi isolado a partir de amostras de um fungo do gênero *Alpova sp.* (*Basidiomycota*, família *Paxillaceae*) homogeneizado em água destilada esterilizada coletada perto de Toulon, na França. O Cedratvírus zaza possui partículas com uma média de 1,1 μm de comprimento e 0,58 μm de largura, dimensões parecidas com as observadas para o Cedratvírus A11. Seu genoma possui aproximadamente 560.000 pares de bases e codifica 636 proteínas. O Brazilian cedratvírus foi isolado a partir de uma amostra de água coletada na Escola de Veterinária da UFMG, Brasil. O Brazilian cedratvírus é menor, com aproximadamente 0,9 μm de comprimento e 0,5 μm de largura. Seu genoma é o menor de todos os representantes dos cedratvírus descritos até o momento, com 460.000 pares de bases e codificando um número igualmente menor de proteínas, sendo 533 no total (Rodrigues *et al*, 2018).

O isolamento do Brazilian cedratvírus sugeriu a origem de uma nova linhagem (linhagem B) dentro do grupo dos cedratvírus. Foi realizada a construção de uma árvore filogenética baseada em sequências de aminoácidos do gene que codifica para a DNA polimerase B dos NCLDVs evidenciando a existência de duas linhagens diferentes dentro do grupo dos cedratvírus (Figura 25) (Rodrigues *et al*, 2018).

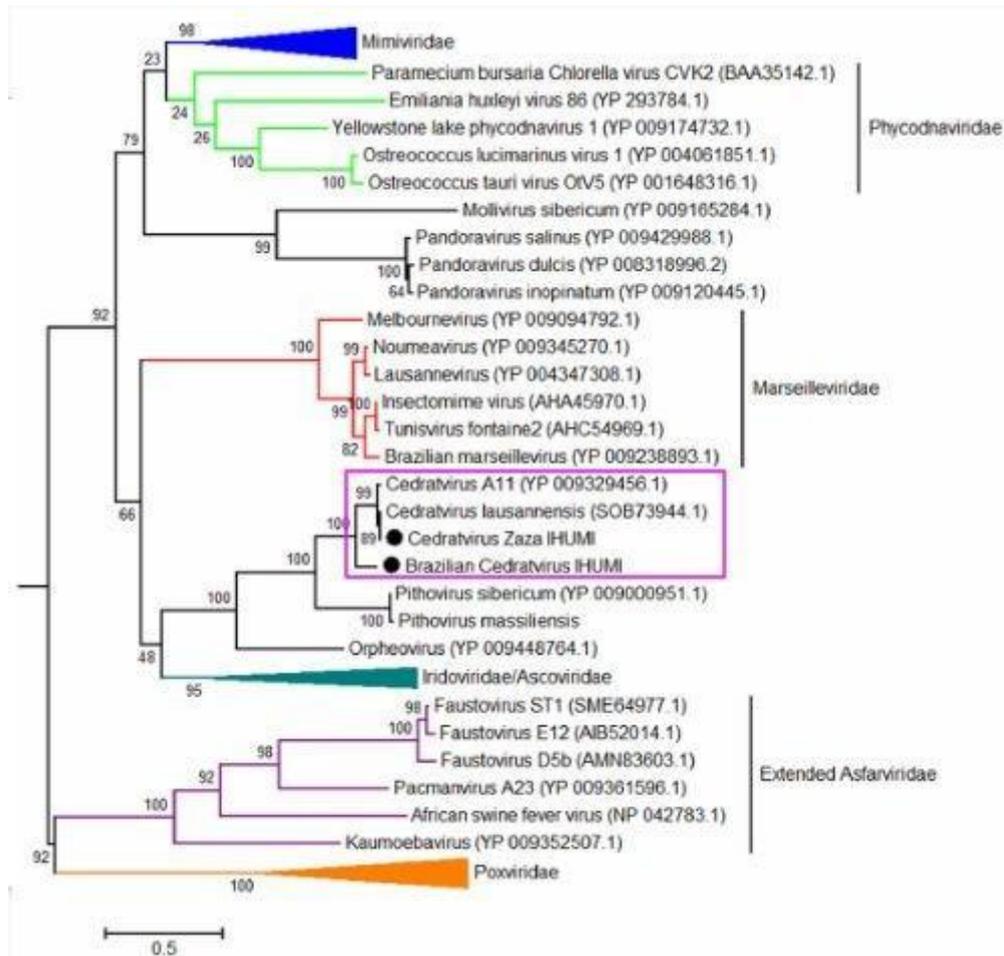


Figura 25. Árvore filogenética com os cedratvírus. Construída baseada em sequências de aminoácidos do gene que codifica para a DNA polimerase B dos NCLDVs. É possível notar a presença de uma segunda linhagem dentro do grupo dos cedratvírus (grupo destacado pelo retângulo). **Fonte:** Adaptado de Rodrigues *et al*, 2018.

1.6.2- Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos cedratvírus é bem parecido com o descrito para os pithovírus. A penetração ocorre via fagocitose, 2 horas pós-infecção se inicia a fase de eclipse com a liberação do DNA viral, posteriormente as fábricas virais começam a ser formadas no citoplasma da célula hospedeira. As fábricas virais dos cedratvírus são elétron-lucentes e portanto, de difícil visualização por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 26). Assim como descrito para outros vírus, são nessas fábricas virais que ocorrem os processos de morfogênese e replicação do DNA.

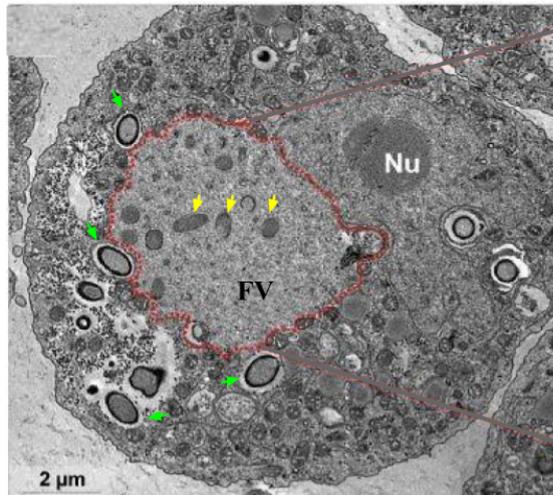


Figura 26. Fábrica viral do cedratvírus getuliensis. Nesta imagem de MET é possível observar partículas virais sendo formadas dentro de uma fábrica viral madura (delimitada em vermelho). As setas amarelas indicam partículas imaturas, ainda sendo formadas, e as setas verdes indicam partículas virais maduras que já saíram da fábrica viral. **FV:** Fábrica viral. **Nu:** Núcleo. **Fonte:** Adaptado de Silva *et al*, 2018.

Após a morfogênese as partículas sofrem um espessamento do capsídeo ao passarem por uma região localizada na periferia da fábrica viral (Figura 27).

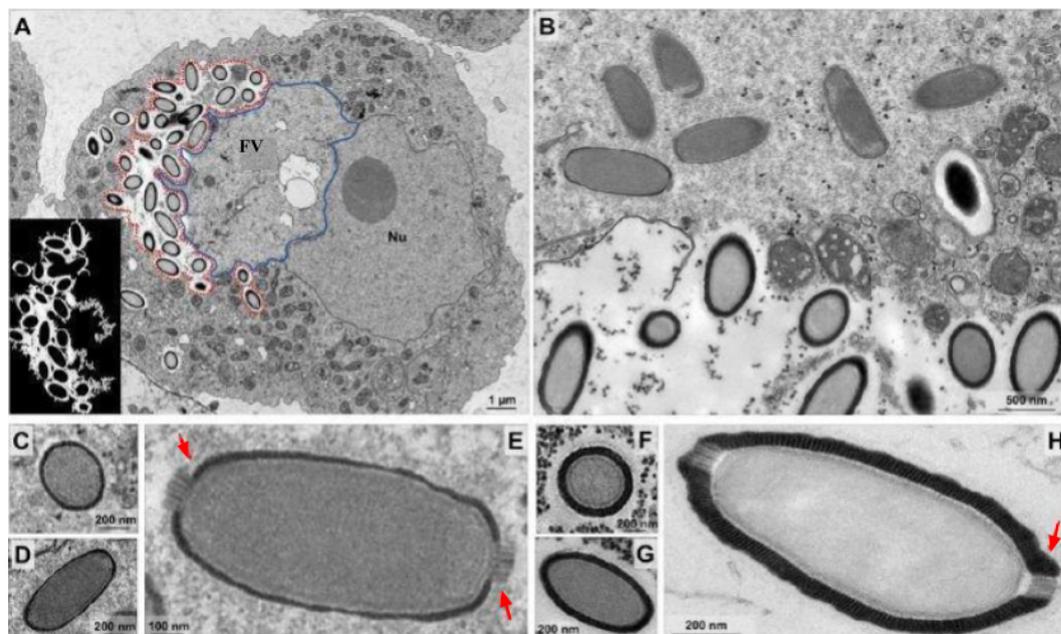


Figura 27. Espessamento das partículas do cedratvírus getuliensis. (A) Partículas virais sofrem espessamento do capsídeo em uma região (contornada em vermelho) na periferia na fábrica viral (contornada em azul), **Barra:** 1 µm. (B) Periferia da fábrica viral com partículas já espessadas (abaixo) e partículas que ainda não passaram pelo processo de espessamento (acima), **Barra:** 500 nm. Secções transversais (C) e longitudinais (D) evidenciando um capsídeo com parede fina que ainda não recobre os poros (setas vermelhas) (E). Secções transversais (F) e longitudinais (G) evidenciando o espessamento do capsídeo, que agora recobre os poros (setas vermelhas) (H). **FV:** Fábrica viral. **Nu:** Núcleo. **Fonte:** Adaptado de Silva *et al*, 2018.

Aproximadamente 12 horas pós-infecção as partículas são liberadas por lise celular

e provavelmente por exocitose também, porém, a via exocítica ainda precisa ser melhor estudada (Andreani et al, 2016; Silva et al, 2018; Rodrigues et al, 2018). Alguns pesquisadores descreveram a observação de estruturas amorfas elétron-densas no citoplasma de algumas células (Figura 28), semelhantes àquelas descritas por Legendre e colaboradores durante o ciclo de multiplicação do pithovírus massiliensis (Silva et al, 2018) (Figura 29).

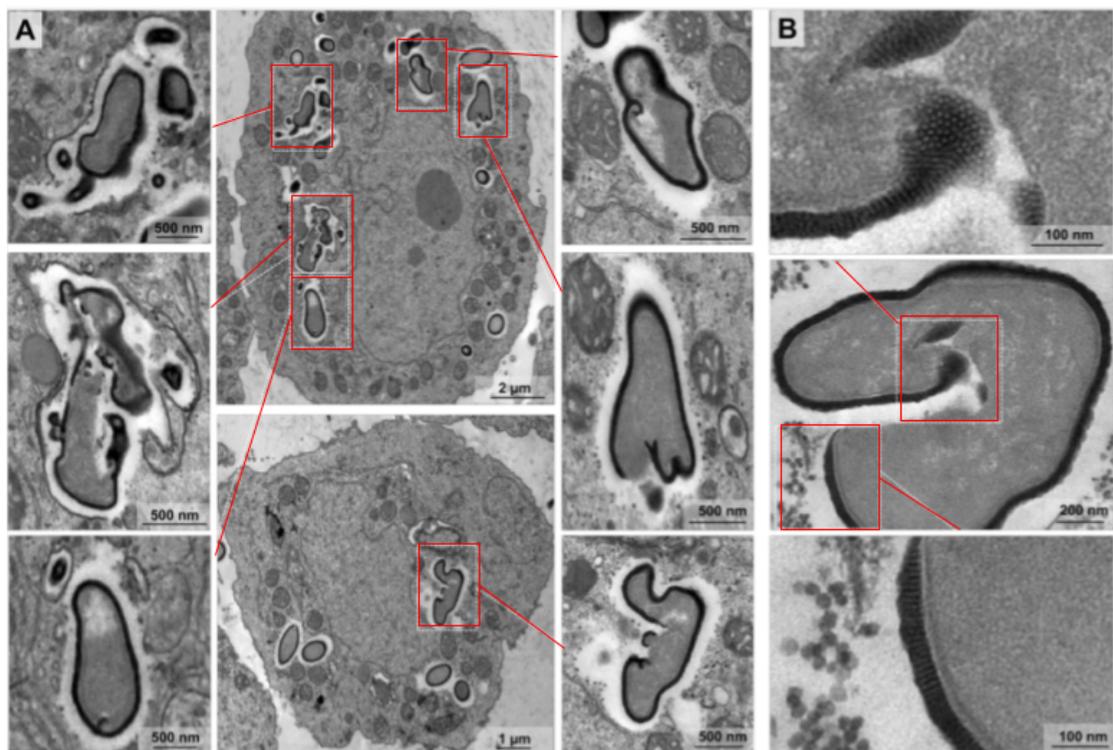


Figura 28. Estruturas amorfas elétron-densas. Estruturas deformadas observadas por imagens de MET durante o ciclo de multiplicação do cedratvírus getuliensis. (A) e (B) Estruturas amorfas de material elétron-denso compostas por porções de corks, capsídeo estriado e membrana visualizadas no citoplasma de algumas células hospedeiras. **Fonte:** Adaptado de Silva *et al*, 2018.

O ciclo de multiplicação dos cedratvírus ainda apresenta muitas lacunas que precisam de mais estudos para serem elucidadas.

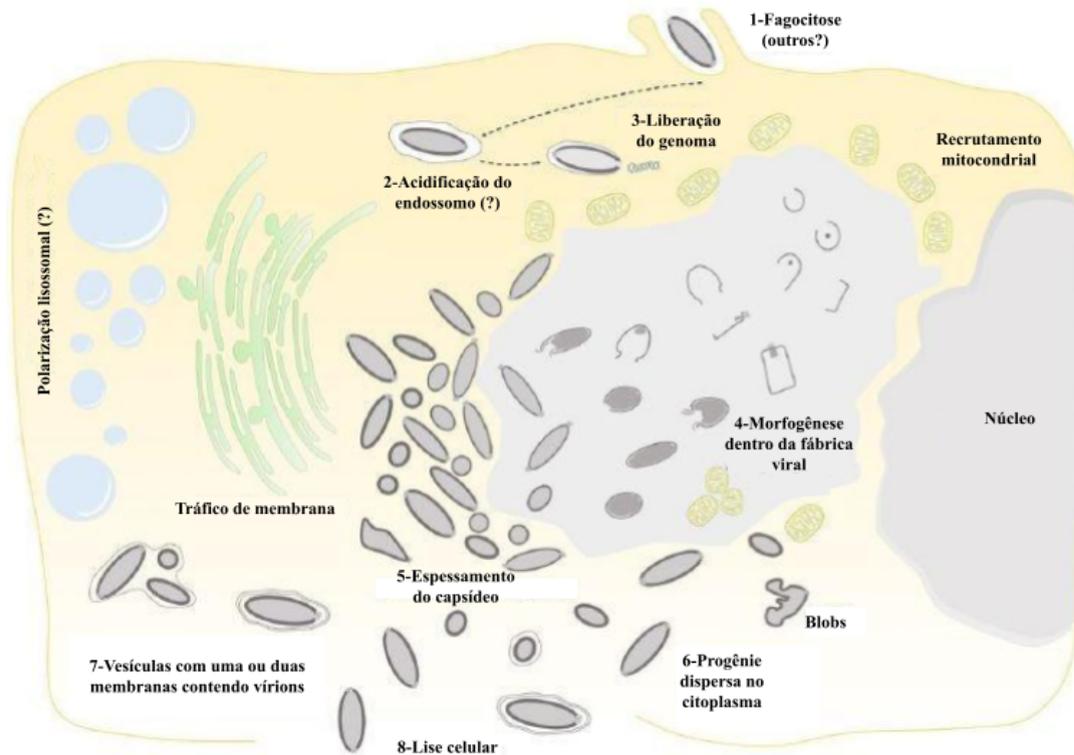


Figura 29. Esquema geral do ciclo de multiplicação dos cedratvírus. No esquema é possível acompanhar as etapas do ciclo de multiplicação, entretanto, algumas etapas ainda precisam ser melhor estudadas. **Fonte:** Adaptado de Silva *et al*, 2018.

1.7- Espectro de hospedeiros dos vírus gigantes

Como supracitado, um estudo sugeriu que os mimivírus infectam e multiplicam em monócitos e macrófagos tanto de seres humanos quanto de murinos (Ghigo et al, 2008). Porém, o principal hospedeiro conhecido relacionado aos vírus gigantes são as amebas de vida livre (AVL).

As AVL são protozoários unicelulares ubíquos, presentes nos mais diversos ambientes como o ar, solo, esgoto, poeira, ambientes marinhos, lagos, lagoas hipersalinas, torres de resfriamento, ductos de ar, além de serem encontrados colonizando peixes, pássaro e mamíferos (incluindo humanos). (Liu et al., 2006; Khan et al., 2007; Castrillón et al, 2013; Siddiqui et al, 2012).

Esses organismos apresentam dois estágios durante seu ciclo de vida: trofozoíto e cisto. O trofozoíto é a forma vegetativa, ou seja, é o estágio em que o organismo está metabolicamente ativo. Nesse estágio o protozoário está sob ótimas condições ambientais, como temperatura e pH ideais e alta disponibilidade de nutrientes, o que permite sua multiplicação, alimentação e locomoção. Enquanto o cisto é a forma de resistência e

metabolicamente inativa. Ao ser submetido a condições ambientais desfavoráveis, esses organismos assumem essa forma, que possui uma dupla parede composta por celulose e proteína e é capaz de manter esse organismo viável por muitos anos mesmo em condições adversas (Khan et al, 2007) (Figura 30).

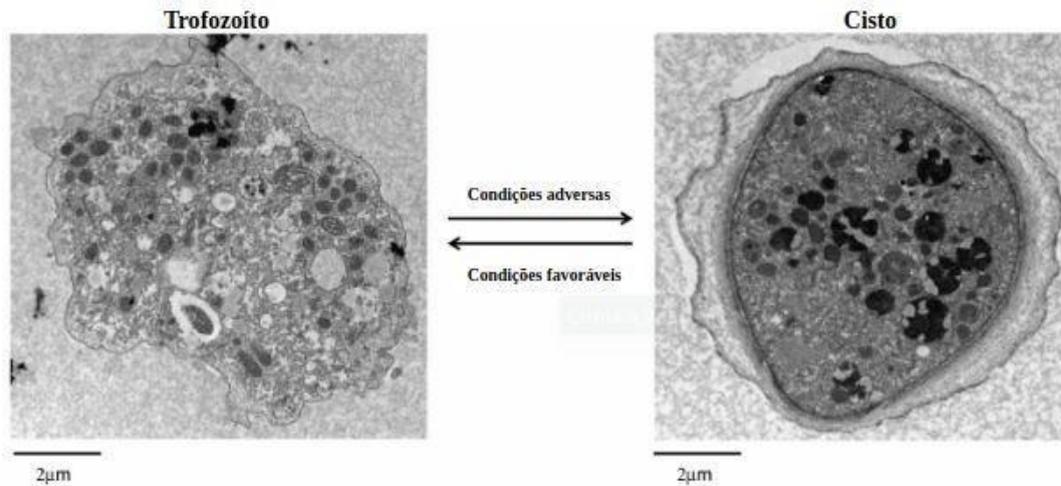


Figura 30. Formas de vida da *Acanthamoeba*. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de amebas do gênero *Acanthamoeba* na forma de trofozoito (esquerda) e de cisto (direita). **Barra:** 2 μm . **Fonte:** Adaptado de Siddiqui *et al*, 2012.

Esses organismos são conhecidos como “Cavalos de Tróia” devido ao fato de serem capazes de fagocitar diversos microorganismos como bactérias, fungos, vírus e outros protistas e mantê-los em seu interior ao mesmo tempo (Siddiqui et al, 2012). Esse fato facilita a ocorrência de eventos de transferência gênica horizontal (TGH) entre todos os microorganismos presentes naquele ambiente, sendo possivelmente responsáveis pelo surgimento de organismos quiméricos (Boyer et al. 2009; Raoult et al, 2010).

Experimentos realizados em 1967 utilizando esferas de látex de tamanhos variados demonstraram que a fagocitose realizada por esses protozoários é estimulada pela presença de partículas com tamanhos acima de 500 nm (Weisman e Korn, 1967). A fagocitose é uma etapa importante no ciclo de multiplicação dos vírus gigantes, uma vez que é dessa forma que esses vírus penetram em seu hospedeiro. Vírus que possuem partículas menores que 500 nm, como os marseillevírus, conseguem reverter essa situação com vias alternativas como a endocitose ou induzindo a fagocitose através de vesículas gigantes ou aglomerados de partículas (Arantes et al, 2016).

Dentro do grupo das AVL, já foi descrito que os vírus gigantes multiplicam em *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba griffini* (Dornas et al,

2015) e em *Vermamoeba vermiformis* (Reteno et al, 2015; Abrahão et al, 2018).

1.7.1- *Acanthamoeba castellanii* e suas características básicas

Amebas do gênero *Acanthamoeba* foram descobertas por Castellani, em 1930 (Castellani, 1930) mas o nome do gênero só foi consolidado em 1931, por Volkonsky (Volkonsky, 1931). Elas fazem parte do grupo das AVL, porém são consideradas também como parasitas oportunistas, estando relacionadas a doenças como ceratite e encefalite (Castrillón e Orozco, 2013; Khan et al, 2006).

Assim como descrito para outras AVLs, a *Acanthamoeba castellanii* apresenta dois estágio no seu ciclo de vida: o trofozoíto (estágio metabolicamente ativo) e o cisto (estágio metabolicamente inativo) (Figura 31) (Khan et al, 2006).

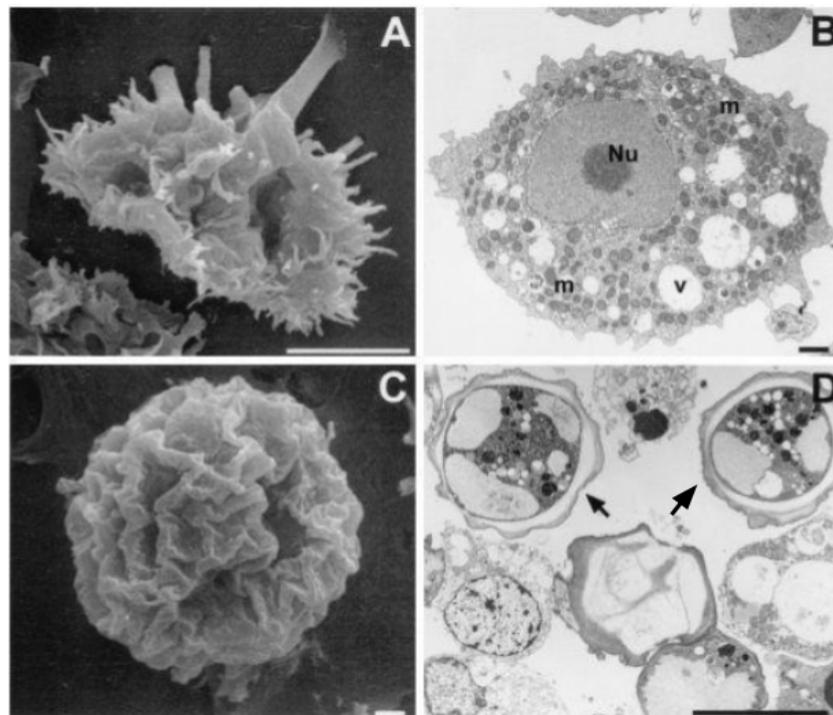


Figura 31. Trofozoítos e Cistos. Imagens de MEV (A e C) e MET (B e D) dos estágios do ciclo de vida de *Acanthamoeba spp.* (A) e (B) Amebas na forma trofozoítica. (C) e (D) Amebas em forma de cisto. As setas indicam a dupla parede presente nos cistos. Nu: Núcleo; m: mitocôndria; v: vacúolo citoplasmático. Barras: 10 μm (A e D) e 1 μm (B e C). Fonte: Adaptado de Marciano-Cabral *et al*, 2003.

Durante a fase trofozoítica, esses organismos se alimentam principalmente via fagocitose, mas podem utilizar também dois outros processos: (1) formação de estruturas temporárias chamadas de *food cups*, utilizadas para a captura de bactérias, fungos e outros

microorganismos e (2) por pinocitose, captando nutrientes dissolutos no ambiente (Marciano-Cabral et al, 2003). A locomoção ocorre através da emissão de pseudópodes, que também são importantes durante a alimentação (Preston et al, 1984; Schuster et al. 1996). Pelo que se conhece até hoje, a reprodução desses organismos é exclusivamente assexuada, por fissão binária, na qual uma célula-mãe origina duas células filhas geneticamente idênticas (Khan et al, 2015). Ainda não há descrição da reprodução sexuada em amebas.

O cisto é a forma de resistência das amebas, elas assumem essa forma quando o ambiente está desfavorável para o seu crescimento. O cisto possui um formato arredondado e uma dupla parede, que confere grande resistência a variações de temperatura, luz ultravioleta, variações de pH e biocidas químicos, por exemplo (Marciano-Cabral et al. 2003, Lloyd, 2014). Esses cistos permitem que as células se mantenham viáveis por longos anos até que o ambiente se torne novamente favorável para o seu crescimento. Assim, ela pode retornar ao seu estado de trofozoíto.

Amebas da espécie *Acanthamoeba castellanii* se mostraram muito promissoras no isolamento de vírus gigantes, uma vez que foi demonstrada uma grande permissividade dessas amebas a infecções por diferentes vírus gigantes, como os mimivírus, pandoravírus, marseillevírus (Dornas et al, 2015), entre vários outros que posteriormente foram isolados utilizando essa espécie de ameba como plataforma. Essa alta permissividade não foi vista para outras espécies de amebas como *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba griffini* e *Vermamoeba vermiformis* (Dornas et al, 2015).

1.8- Isolamento e distribuição de outros vírus gigantes no mundo

Além das famílias e dos grupos virais já citados neste trabalho, vários outros grupos de vírus gigantes foram isolados ao longo desses 18 anos a partir de diversos tipos de amostras e em diferentes países em todo o mundo.

1.8.1- Mollivírus

Da mesma amostra de *permafrost* que foi isolado o Pithovírus sibericum, foi isolado também em *Acanthamoeba* um vírus muito diferente morfológicamente, que foi denominado Mollivírus sibericum. O mollivírus apresenta uma partícula esférica com 500-600 nm de diâmetro que aparenta ser coberta por um tegumento com “pelos” e possui

uma depressão no ápice (Figura 32). Seu genoma é composto por uma molécula de DNA fita dupla linear de aproximadamente 651 kpb, codificando 523 proteínas (Legendre et al, 2015).

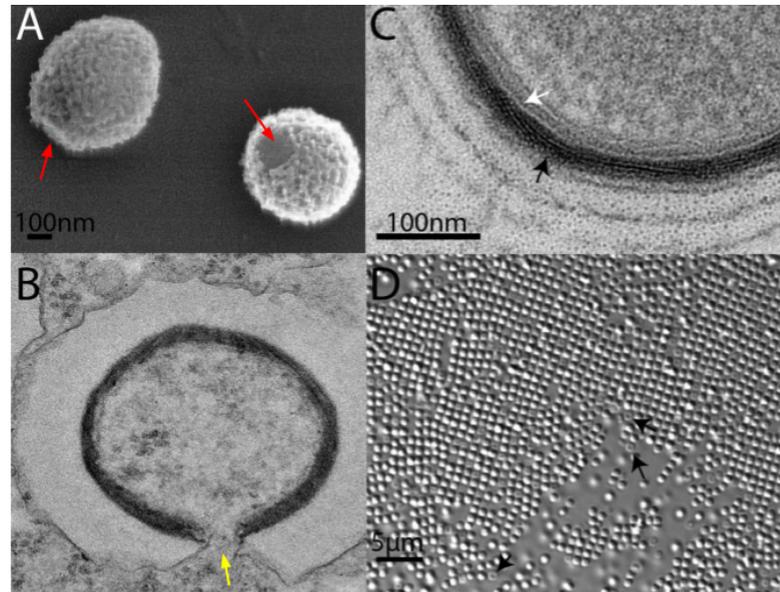


Figura 32. Partículas de mollivírus. (A) Observação da morfologia externa, destacando a estrutura do ápice da partícula (indicada pela seta vermelha), a partir de MEV. **Barra:** 100 nm. (B) Imagem de MET de uma partícula aberta após a fusão (indicada pela seta amarela) da sua membrana com a membrana do fagossomo. (C) Visão ampliada do tegumento presente nas partículas de mollivírus. A seta preta destaca a camada feita de malha de fibrilas e a seta branca indica a membrana interna. **Barra:** 100 nm. (D) Imagem obtida por microscopia de luz (Nomarski optics 63 ×) de partículas de mollivírus. A seta preta aponta para uma depressão no ápice observada em algumas partículas. **Barra:** 5 µm. **Fonte:** Adaptado de Legendre *et al*, 2015.

Em 2020 foi descrito o segundo membro desse grupo e foi denominado Mollivírus kamchatka. Este vírus foi isolado de uma amostra coletada da superfície do solo na margem do rio Kronotsky em Kamchatka. Sua partícula possui morfologia e tamanho semelhante ao do mollivírus sibericum e seu genoma é ligeiramente menor, com 648 kpb codificando 480 proteínas (Eugene Christo-Foroux et al, 2020). O isolamento desse novo mollivírus permitiu a realização de melhores análises filogenéticas, confirmando então que esses vírus são próximos aos pandoravírus, porém, se agrupam em um ramo diferente, formando assim uma proposta nova família denominada de *Molliviridae* (Eugene Christo-Foroux et al, 2020).

1.8.2- Faustovírus

Até 2015 os vírus gigantes haviam sido isolados somente em amebas do gênero

Acanthamoeba, quando Reteno e colaboradores descreveram pela primeira vez o isolamento de um vírus gigantes em outra espécie de ameba, a *Vermamoeba vermiformis*. Foram isolados oito novos vírus, denominados Faustovírus, sendo o Faustovírus E12 o protótipo da família. Esses vírus foram filogeneticamente semelhantes ao African swine fever vírus (ASFV), pertencente à família *Asfarviridae*. Os faustovírus apresentam um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 200 nm (Figura 33), muito parecido com os marseillevírus mas não possuem fibrilas. Além disso, seu genoma é maior com aproximadamente 462.000 pares de bases (Reteno et al, 2015). Em 2018 foi descrito mais um isolado de faustovírus, isolado a partir de amostras de água da Lagoa da Pampulha situada em Belo Horizonte, Brasil e foi nomeado Faustovírus mariensis (Borges et al, 2019)

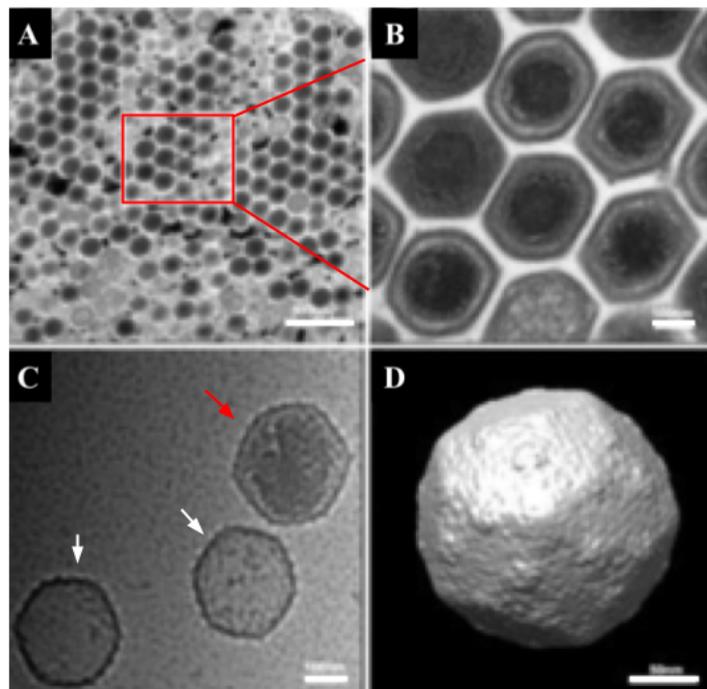


Figura 33. Partículas de faustovírus. (A) Observação por MET de partículas de faustovírus aglomeradas no citoplasma celular formando uma estrutura parecida com favo de mel. **Barra:** 500 nm. (B) Visão mais aproximada da imagem A, evidenciando o capsídeo com morfologia icosaédrica de aproximadamente 200 nm de comprimento. **Barra:** 100 nm. (C) Observação de partículas de faustovírus em diferentes estágios de maturação por Micrografia Crioelétrica. As partículas vazias ou imaturas (indicadas pelas setas brancas) apresentam 1.600 Å de diâmetro, enquanto as partículas maduras completas (indicada pela seta vermelha) apresentam 1.750 Å de diâmetro. **Barra:** 100 nm. (D) Reconstrução de partículas de faustovírus por Micrografia Crioelétrica. **Barra:** 50 nm. **Fonte:** Adaptado de Reteno *et al*, 2015.

1.8.3- Kaumobavírus

Em 2016 foi isolado mais um vírus relacionado aos asfarvírus isolado também em *Vermamoeba vermiformis*, assim como os faustovírus. Esse vírus foi isolado a partir de

amostras de esgoto da cidade de Jeddah, localizada na Arábia Saudita e foi denominado Kaumoebavírus, apresentando um capsídeo de simetria icosaédrica de 250 nm (Figura 34) e um genoma com 350.000 pares de bases (Bajrai et al, 2016).

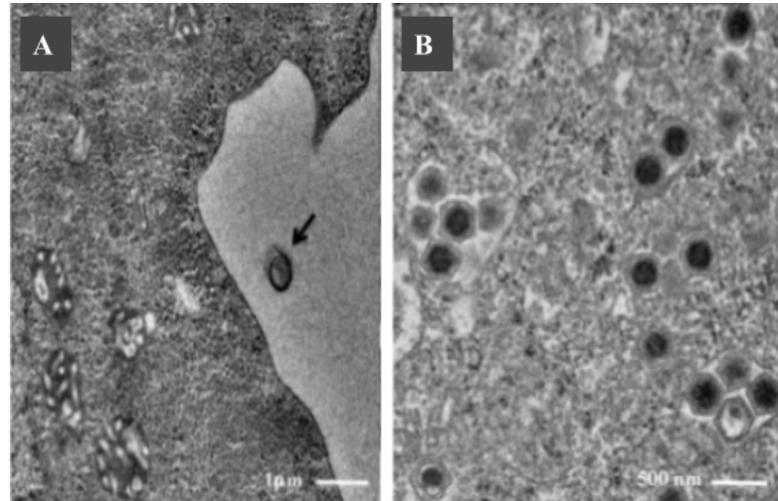


Figura 34. Partículas de kaumoebavírus. (A) Observação por MET de partículas de kaumoebavírus (indicada pela seta preta) sendo fagocitadas para o interior de *Vermamoeba vermiformis*. **Barra:** 1 μ m. (B) Partículas de kaumoebavírus no citoplasma da célula hospedeira, comumente agrupadas de duas a quatro partículas. **Barra:** 500 nm. **Fonte:** Adaptado de Bajrai *et al*, 2016.

1.8.4- Pacmanvírus

Em 2017, foi isolado outro vírus que também se mostrou relacionado a família *Asfarviridae*. Porém, diferente dos faustovírus e kaumoebavírus, foi isolado em *Acanthamoeba castellanii*. Denominado Pacmanvírus, esse novo vírus foi isolado a partir de uma amostra ambiental coletada na Argélia e apresenta uma partícula também icosaédrica com 200 nm (Figura 35) e um genoma de 395.000 pares de bases (Andreani et al, 2017).

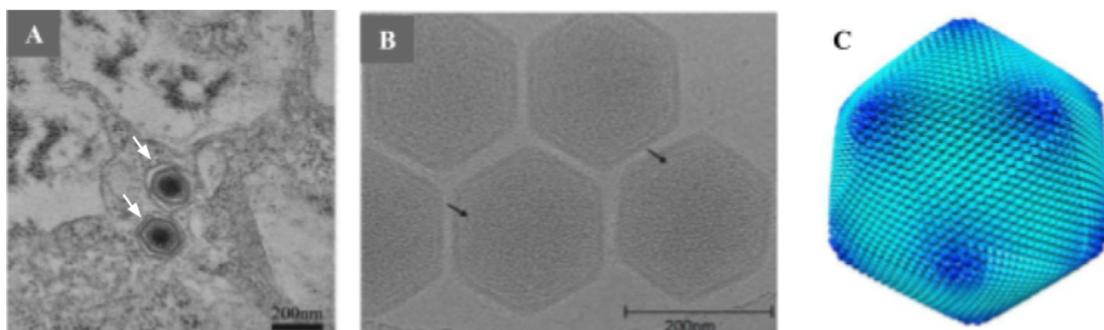


Figura 35. Partículas de pacmanvírus. (A) Observação por MET de partículas de pacmanvírus (indicadas pelas setas brancas) no citoplasma da célula hospedeira. **Barra:** 200 nm. (B e C) Reconstrução 3D por Crio-ME de partículas de pacmanvírus. (B) Imagem destacando sua membrana interna (indicada pelas setas

pretas). **Barra:** 200 nm. **(C)** Seus vértices estão coloridos de azul escuro para maior clareza da imagem. **Fonte:** Adaptado de Andreani *et al*, 2017.

1.8.5- Orpheovírus

Mais um novo vírus foi isolado por Andreani e colaboradores no início de 2018, nomeado de Orpheovírus IHUMI-LCC2. Este vírus foi isolado em *Vermamoeba vermiformis* a partir de amostra de fezes de rato coletadas em La Ciotat, na França. Os orpheovírus apresentam partículas ovais de 900-1300 nm e possuem um poro apical, semelhante ao dos pandoravírus (Figura 36). Seu genoma possui aproximadamente 1,47 Mb codificando cerca de 1512 proteínas (Andreani et al, 2018).

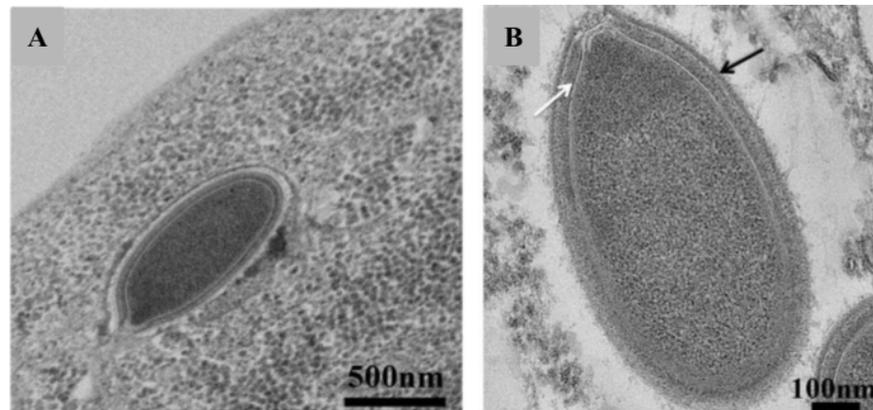


Figura 36. Partículas de orpheovírus. (A) Observação por MET de uma partícula de orpheovírus no interior da célula hospedeira. **Barra:** 500 nm. (B) Partícula madura de orpheovírus, evidenciando a membrana externa (indicada pela seta preta) e o espaço denso médio (indicado pela seta branca). **Barra:** 100 nm. **Fonte:** Adaptado de Andreani *et al*, 2018.

1.8.6- Medusavírus

Em 2019 foi isolado um novo vírus gigante em um cultura de *Acanthamoeba* a partir de uma amostra de água termal do Japão, este vírus foi denominado Medusavírus. O medusavírus apresenta uma partícula com morfologia icosaédrica de 250 nm de diâmetro (Figura 37). Seu capsídeo é circundado por espigões com uma “cabeça” esférica, uma característica nunca vista antes para os vírus gigantes. Seu genoma é composto por DNA dupla fita linear de aproximadamente 381 kpb, codificando cerca de 481 proteínas. A partir de análises da dados filogenéticos, foi proposto que o medusavírus inaugurasse uma nova família, denominada *Medusaviridae*. Um fato interessante desse vírus é que, diferente da dos outros vírus gigantes, sua replicação ocorre no núcleo celular, enquanto no citoplasma

ocorre a parte da montagem das partículas. Outra característica marcante desse vírus é que, segundo os autores, durante o seu ciclo de multiplicação o vírus parece induzir o encistamento em uma subpopulação de amebas infectadas, por isso o nome Medusa (Yoshikawa et al, 2019).

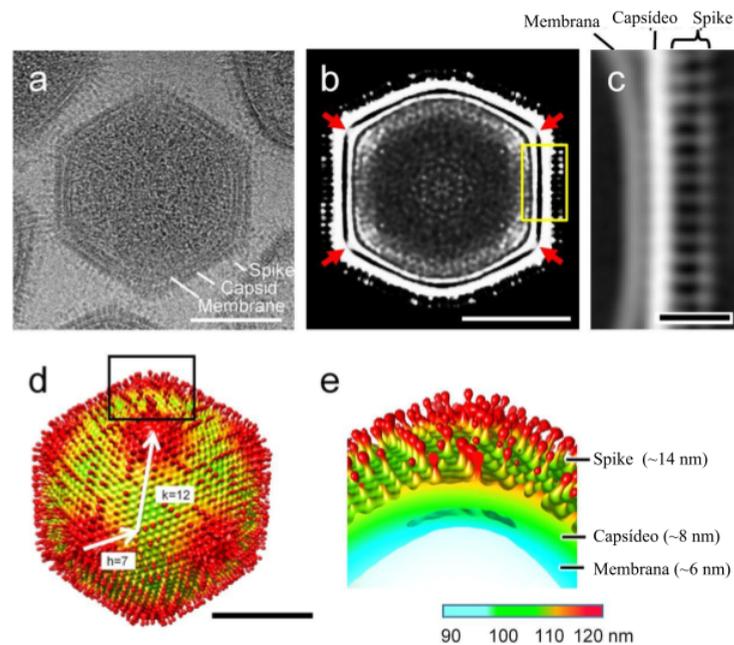


Figura 37. Partícula do medusavírus. (A) Imagem de Crio-EM de uma partícula de medusavírus, destacando a membrana, o capsídeo e a estrutura spike. **Barra:** 100 nm. (B) Reconstrução 3D de uma partícula de medusavírus com um corte central. A seta vermelha aponta para regiões em que a membrana interna está estendida e diretamente conectada ao capsídeo. **Barra:** 100 nm. (C) Visão ampliada da figura B (quadrado amarelo) na qual membrana, capsídeo e spike estão identificados. **Barra:** 20 nm. (D) Observação da superfície da reconstrução 3D de uma partícula de medusavírus. O mapa de cores da figura E indicam os raios na partícula. **Barra:** 100 nm. (E) Visão ampliada da figura D evidenciando as regiões e larguras de cada camada (membrana, capsídeo e spike). **Fonte:** Adaptado de Yoshikawa *et al*, 2019.

Todos esses achados demonstram o quanto esses vírus são diversos e estão presentes no mundo inteiro (Figura 38). Além disso, reforçam a importância dos estudos de prospecção para o enriquecimento do conhecimento sobre esses vírus e seu papel ecológico, além de sua riqueza e distribuição na natureza.

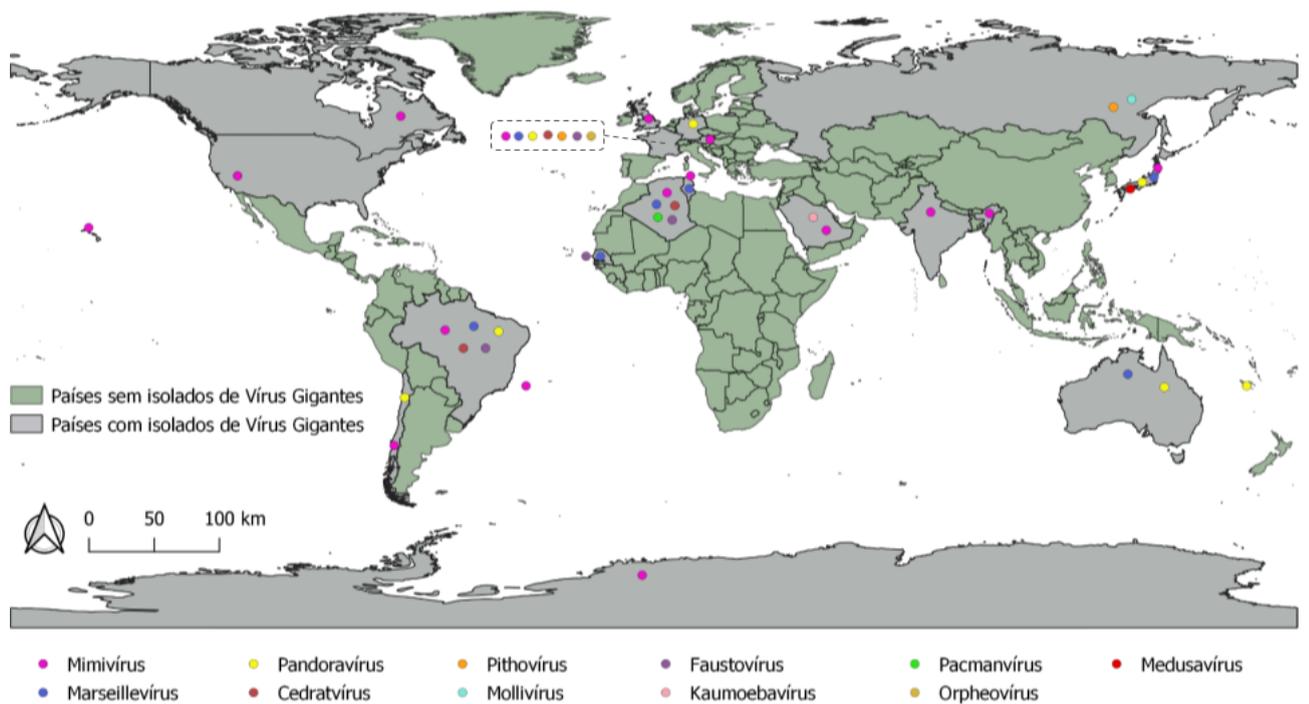


Figura 38. Mapa representativo da distribuição dos vírus gigantes de ameba no mundo. Os países em cinza já isolaram algum vírus de ameba e os países em verde ainda não isolaram. Cada grupo viral está representado por um ponto com cores diferentes, conforme legenda na imagem. **Fonte:** Elaborado pela autora.

1.9- Prospecção de vírus gigantes no Brasil

O estudo dos vírus gigantes no Brasil é recente, teve início em 2011 com a criação do Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes (GEPVIG), do Laboratório de Vírus da UFMG. O grupo tem como objetivo isolar e caracterizar novos vírus gigantes, que contribui para expandir a compreensão do papel desses vírus na natureza e na relação com outros microrganismos.

O primeiro vírus gigante isolado pelo grupo foi o Samba vírus (SMBV), a partir de amostras de água coletadas do Rio Negro durante uma expedição à Amazônia. Esse vírus possui aproximadamente 574 nm de diâmetro (Figura 39A) e seu genoma possui cerca de 1,2 Mb (Campos et al, 2014).

Após o SMBV, vários outros mimivírus foram isolados de diferentes amostras ambientais. O Niemeyer vírus (NYMV) foi isolado a partir de amostra de água coletada da lagoa da Pampulha, na cidade de Belo Horizonte, MG (Boratto et al, 2015). O Kroon vírus (KROV) foi isolado de amostras de água da lagoa central da cidade de Lagoa Santa, MG (Boratto et al, 2017). O Amazônia vírus (AMAV) que também foi isolado de amostras de água do Rio Negro (Assis et al, 2015). O Oyster vírus foi isolado a partir de amostras de ostras coletadas de uma fazenda situada na costa sul de Florianópolis, SC (Andrade et al,

2014). Além desses, diversos outros mimivírus foram isolados a partir de amostras de diferentes ambientes do Hospital das Clínicas situado na cidade de Belo Horizonte, MG (Dos Santos Silva et al, 2015). Todos esses mimivírus foram relacionados com mimivírus da linhagem A.

Além da família *Mimiviridae*, o grupo isolou também um membro da família *Marseilleviridae*, denominado Brazilian marseillevírus que foi isolado a partir de amostra de água proveniente da lagoa da Pampulha, situada na cidade de Belo Horizonte, MG. Esse vírus é menor que os mimivírus, com aproximadamente 250 nm de diâmetro (Figura 39D). Além disso, esse vírus é filogeneticamente distinto dos demais marseillevírus descritos até então, sugerindo assim, a construção de uma nova linhagem (linhagem D) (Dornas et al, 2016).

Em 2018 foi publicado um grande estudo de prospecção por Andrade e colaboradores, no qual foram isolados vários vírus gigantes, incluindo vírus de diferentes grupos: 26 mimivírus da linhagem A, 13 mimivírus da linhagem B, 2 mimivírus da linhagem C, 23 mimi sem classificação definida, além de 1 marseillevírus, 2 pandoravírus, denominados Pandoravírus pampulha e Pandoravírus tropicalis, e 1 cedratvírus, denominado cedratvírus getuliensis (Figura 39C) (Andrade et al, 2018).

Em 2018 Abrahão e colaboradores descreveram dois novos isolados que chamaram muita atenção, o Tupanvírus Soda Lake e Tupanvírus Deep Ocean. Estes são os maiores vírus dentre todos descritos até hoje, seu comprimento varia de 1,2 a 2,3 μm (Figura 39E). Diferente de outros vírus gigantes, os tupanvírus infectam e multiplicam em mais de uma espécie de ameba, dentre elas estão *Acanthamoeba sp.*, *Vermamoeba vermiformis*, *Dictyostelium discoideum* e *Willartia magna* (Rodrigues et al, 2019). Estes vírus se destacam na virosfera pois, apesar de serem membros da família *Mimiviridae*, apresentam uma morfologia muito diferente dos demais isolados. Os tupanvírus possuem uma “cabeça” acoplada a uma “cauda” e todo o capsídeo é coberto por fibrilas (Figura 39E). Seu genoma é composto por DNA dupla fita linear de 1,44-1,51 Mb codificando para 1276-1425 proteínas preditas. Mais uma característica dos tupanvírus que merece destaque é o fato deles representarem o vírus com o maior aparato de genes relacionados à tradução já descrito na virosfera até o momento, envolvendo dezenas de tRNAs, aminoacil-tRNA sintetases relacionadas a todos os 20 aminoácidos, 11 fatores de tradução (envolvidos em todas as fases), além de fatores relacionados a modificações de proteínas ribossomais e na maturação de tRNA/mRNA. Apesar de serem membros da família *Mimiviridae*, a sua complexidade genômica e a construção de árvores filogenéticas sugerem que esses vírus

compõem um novo gênero (Abrahão et al, 2018).

Mais um cedratvírus foi isolado pelo grupo em 2018, a partir de amostras de água suplementada com biofloco. O novo isolado foi chamado de Brazilian cedratvírus, esse vírus é um pouco menor do que os cedratvírus isolados anteriormente, medindo cerca de 0,9 μm de comprimento. Além do seu menor tamanho, esses vírus apresentaram também um menor genoma, com aproximadamente 460.000 pares de bases. A partir de análises filogenéticas foi sugerida a criação de uma segunda linhagem dentro do grupo dos cedratvírus (Rodrigues et al, 2018).

Ainda em 2018, foi publicado por Andrade e colaboradores o isolamento de um novo pandoravírus, denominado Pandoravírus kadiweu. Esse vírus foi isolado a partir de uma amostra de água coletada em Bonito, Mato Grosso do Sul e possui dimensões bem parecidas com as dos demais pandoravírus isolados anteriormente (Andrade et al, 2018).

Em 2019, nosso grupo publicou dados sobre o isolamento do primeiro faustovírus do Brasil denominado Faustovírus mariensis (Figura 39B) cuja morfologia e tamanho da partícula se assemelham ao faustovírus isolado anteriormente (Borges et al, 2019). Porém, um fato curioso sobre esse vírus chamou atenção dos pesquisadores. Eles observaram por imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão que, durante a caracterização do seu ciclo de multiplicação foram encontrados cistos de amebas com partículas de faustovírus no seu interior (Borges et al, 2019). Esse achado foi muito interessante, pois nunca havia sido descrito para vírus. Ao contrário dos mimivírus, que são capazes de inibir o encistamento das amebas após sua penetração (Boratto et al, 2015), os faustovírus não conseguem e, por isso, grande parte das amebas encistam após a penetração dos faustovírus (Borges et al, 2019).

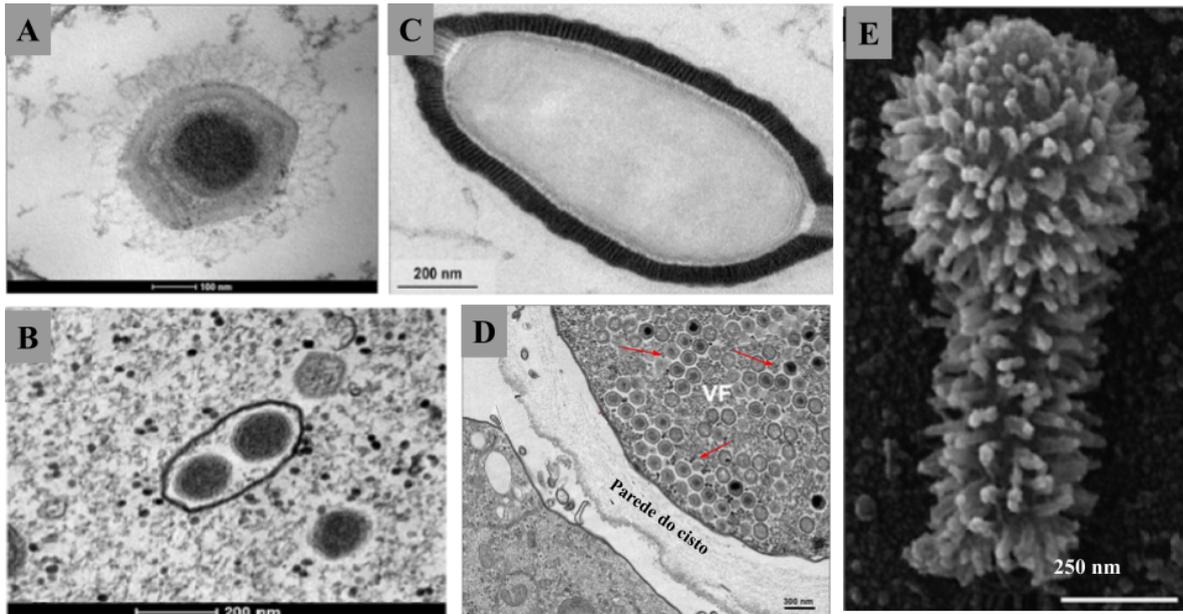


Figura 39. Painel de alguns vírus gigantes isolados no Brasil. (A) Partícula de Samba vírus (SMBV) observada por MET. **(B)** Partículas de Brazilian marseillevirus (BrMsV) observadas por MET. **(C)** Partícula de Cedratvírus getuliensis observada por MET. **(D)** Partículas de faustovírus mariensis (indicados pelas setas vermelhas) dentro de um cisto de *Vermamoeba vermiformis* observado por MET. VF: Fábrica viral. **(E)** Partícula de Tupanvírus observada por MEV. **Fonte:** Adaptado de Campos *et al*, 2014; Dornas *et al*, 2016; Silva *et al*, 2018; Borges *et al*, 2019 e Abrahão *et al*, 2018.

2 - JUSTIFICATIVA

Desde o isolamento do *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) em 2003, primeiro membro da família *Mimiviridae* a ser isolado e descrito, a busca por novos vírus gigantes foi intensificada, resultando na descoberta de uma nova família viral, denominada *Marseilleviridae*, além de outros vírus que ainda não foram reconhecidos pelo ICTV como os pandoravírus, pithovírus, faustovírus, mollivírus, cedratvírus, kaumobavírus, pacmanvírus, orpheovírus e medusavírus. Apesar do isolamento de centenas de novos vírus nos últimos 18 anos, ainda existem muitas lacunas acerca da diversidade, riqueza e importância ecológica desses organismos.

Apesar da importância e da grande quantidade de informações sobre diversidade e riqueza viral que são obtidas através de estudos de metagenômica, eles não substituem os estudos envolvendo isolamento viral, uma vez que a metagenômica identifica apenas sequências de organismos conhecidos presentes naquele ambiente. O isolamento viral, por sua vez, permite a realização de uma gama mais ampla de caracterizações que não são possíveis apenas com metagenômica, relacionados, por exemplo, ao ciclo de multiplicação, interação com o hospedeiro e outros organismos, além de contribuir para análises genômicas mais aprofundadas.

Estudos anteriores demonstraram que a ameba da espécie *Acanthamoeba castellanii* parece ser mais permissiva a diferentes grupos de vírus gigantes do que as outras espécies testadas, tornando possível o isolamento de uma maior diversidade de grupos virais e, por este motivo, foi a espécie escolhida para realizar a prospecção no presente trabalho.

O Brasil é um país que apresenta grande diversidade de ambientes, abrangendo seis biomas: Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga, Pampa e Pantanal. Até hoje, não existe nenhum estudo que tenha realizado prospecção a partir de amostras coletadas de todos os biomas brasileiros. A maioria desses ambientes ainda são pouco explorados, temos poucas informações a respeito da diversidade e riqueza de vírus de amebas no Brasil. A prospecção de amostras coletadas desses locais expande o conhecimento da virosfera no Brasil.

Neste contexto, o presente trabalho realizou prospecção de amostras ambientais de água doce, água salgada, esgoto, solo e lama coletadas dos seis biomas brasileiros na tentativa de isolar e identificar novos vírus, uma vez que os estudos de prospecção se tornam imprescindíveis para a expansão do conhecimento acerca da diversidade, riqueza e distribuição desses vírus na natureza, bem como na compreensão do seu papel ecológico.

Além disso, a descoberta e identificação de novos vírus abre portas para diversos estudos que nos ajudam a compreender melhor o ciclo de multiplicação desses organismos que, conseqüentemente, também nos ajuda a entender os aspectos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. O isolamento de novos vírus ajuda também na elucidação da história evolutiva dos NCLDV's.

3 - OBJETIVOS

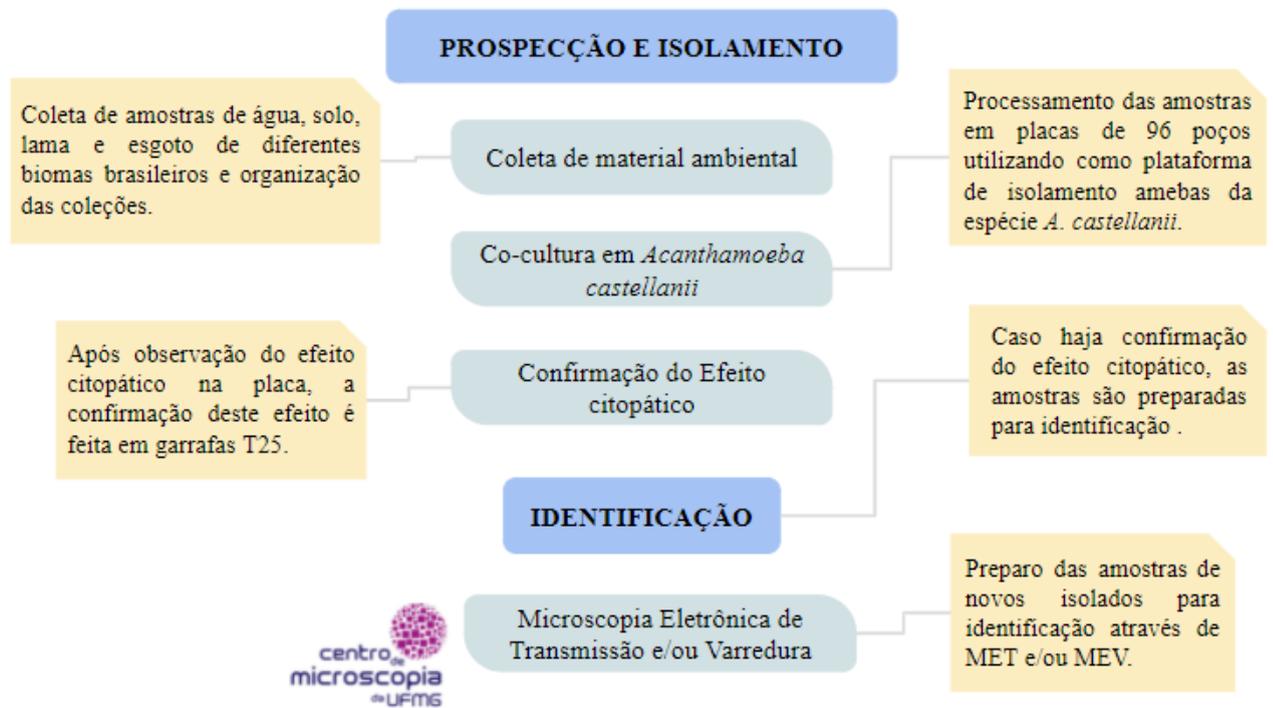
3.1- Objetivo geral

Isolar e identificar morfológicamente novos vírus de *Acanthamoeba castellanii*, a partir de diferentes tipos de amostras obtidas em biomas brasileiros.

3.2- Objetivos específicos

- Realizar prospecção de vírus de ameba a partir de coleções de amostras ambientais previamente coletadas;
- Obter novos isolados de vírus de amebas a partir de amostras de água doce, água salgada, esgoto, solo e lama coletadas em diferentes biomas brasileiros;
- Identificar os novos isolados morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão e/ou microscopia eletrônica de varredura.

4 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO



5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- Prospecção de Vírus Gigantes

A prospecção de vírus gigantes é o processo de busca por novos isolados. Para isto, é necessário a escolha do hospedeiro que será utilizado para o isolamento viral, as coleções de amostras que serão testadas e as técnicas que serão utilizadas para esse fim.

5.1.1- Sistema celular

Neste trabalho foi utilizada apenas a ameba de vida livre da espécie *Acanthamoeba castellanii* provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC 30234) (Maryland, EUA) em todos os experimentos. Essas amebas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Amebíases do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG. As amebas foram cultivadas em garrafas de cultivo celular, utilizando meio Peptona-Extrato de levedura-Glicose (PYG - Peptone-Yeast extract-Glucose) cujo preparo está descrito na seção de Anexos. O meio PYG foi suplementado com 100 UI/mL de Penicilina (Cellofarm, Brasil), 0,25 µg/mL de Fungizona (Cultilab, Brasil) e 0,1 mg/mL de Estreptomicina (Sigma-Aldrich, U.S.A).

Os subcultivos foram realizados em garrafas de cultivo celular T-25 e T-75 (Kasvi, Brasil) ou em garrafas de cultura de vidro (300 cm²) 3 vezes por semana, ou de acordo com a necessidade. Para realizar os subcultivos, as amebas foram desprendidas mecanicamente da monocamada com batidas na garrafa, quantificadas em câmara de Neubauer e a quantidade necessária foi inoculada em uma nova garrafa com meio novo.

Para a realização da prospecção, uma quantidade de 4×10^4 amebas por poço foram cultivadas em placas de 96 poços (Kasvi, Brasil) utilizando meio PYG de prospecção, que é o meio PYG suplementado com mais três antibióticos: 0,004 mg/mL de vancomicina (Inlab, Brasil), 0,004 mg/mL de ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, U.S.A) e 0,020 mg/mL de doxiciclina (Sigma-Aldrich, U.S.A). As garrafas de manutenção e as placas de prospecção foram vedadas e incubadas em estufa ou em roller (estufa rotativa) a uma temperatura próxima de 30°C e sem CO₂.

5.1.2- Coleta das amostras e organização das coleções

As amostras foram coletadas de 2012 a 2019 por membros do GEPVIG ou por colegas que gentilmente se ofereceram para colaborar com este trabalho. As coletas foram realizadas com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob os números de identificação: 33326-2 e 34293-2. A maioria das coletas foram feitas utilizando principalmente microtubos de 1,5 mL ou tubos cônicos de 50 mL, mas algumas foram feitas em garrafas plásticas (PET). Após a coleta, as amostras passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento (processo para evitar contaminação posteriormente) e foram organizadas em coleções. Para isso cada amostra foi alíquotada em microtubos de 1,5 mL, sendo de 1 a 10 alíquotas de 1 mL, dependendo da quantidade inicial da amostra, e foram armazenadas a -20°C.

Ao final da organização foram obtidas 23 coleções, tendo sido coletadas de diferentes estados e biomas brasileiros. Para a definição correta de cada um dos biomas, as coordenadas foram utilizadas no site <http://pnla.mma.gov.br/chechar-coordenadas>, o qual possui uma opção de mostrar um mapa dos biomas indicando a localização das coordenadas oferecidas inicialmente. Para este trabalho foram obtidas amostras de diferentes estados brasileiros: Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Essas amostras resultaram em 1 coleção do bioma Pantanal, 1 coleção do bioma Caatinga, 1 coleção do bioma Amazônia, 1 coleção do bioma Pampa, 5 coleções do bioma Mata Atlântica, 13 coleções do bioma Cerrado e 1 coleção sem bioma identificado. A tabela completa pode ser visualizada no tópico 6.1.

5.1.3- Técnica de isolamento (Prospecção)

Para a realização desta técnica é feito o processamento prévio das amostras. Para amostras de água e esgoto foi realizada uma diluição na razão de 1:10 para cada alíquota. Para amostras de lama foi necessário esperar o sedimento decantar primeiro e posteriormente realizar uma diluição na razão de 1:10 para cada alíquota com o conteúdo líquido do sobrenadante. Para as amostras de solo, foi coletado 100 g de sedimento e adicionado 300 µL de água de injeção, resultando em uma primeira diluição de 1:4; este conteúdo foi então vortexado e a amostra foi deixada na geladeira durante uma noite para a decantação do sedimento. Após este período, foi realizada uma diluição na razão de 1:10 para cada alíquota com o conteúdo líquido do sobrenadante. As diluições de 1:10 foram feitas utilizando tampão fosfato salina 1x (PBS - do inglês “Phosphate Buffer Saline”).

Para essa técnica de isolamento foram utilizadas placas de 96 poços (Kasvi, Brasil) e foram inoculados 100 μL com 4×10^4 amebas por poço, utilizando o meio PYG de prospecção. Para a primeira passagem, cada amostra é inoculada em dois poços, sendo um poço contendo 100 μL da amostra original e outro poço contendo 100 μL da amostra diluída de 1:10. No caso de amostras de solo são utilizadas apenas as amostras diluídas 1:4 e 1:10. Foi feita então uma co-cultura com 100 μL de *A. castellanii* e 100 μL de cada amostra, para o controle celular foram separados 12 poços ao final da placa e adicionado 100 μL de PBS 1x por poço. Ao final da primeira passagem, cada duplicata foi coletada juntas (o poço com a amostra original + o poço com a amostra diluída), armazenadas em um microtubo de 1,5 mL e mantidas congeladas a -20°C até a inoculação em uma nova placa. Para a segunda e terceira passagens não foram feitas novas diluições, sendo inoculadas as amostras coletadas da placa anterior em duplicata. Em todas as passagens a placa foi vedada e mantida em estufa a aproximadamente 30°C , sendo monitorada diariamente, durante sete dias. Quando contaminação por fungo ou bactéria foi observada, amostras de alíquotas de passos anteriores foram novamente utilizadas, sendo submetidas a 3 novos ciclos de congelamento e descongelamento da alíquota e, se necessário, submetidas a uma nova diluição 1:10 antes de tentar processá-la novamente.

Ao longo dessas três passagens, os poços que apresentaram efeito citopático (ECP) (os mais comuns são arredondamento e lise celular) foram coletados e armazenados para uma posterior confirmação. Para a confirmação desse efeito citopático foram utilizadas garrafas de cultivo celular T-25 (Kasvi, Brasil) contendo 1×10^6 amebas em meio PYG de prospecção. Estas células foram infectadas com 50 μL do conteúdo coletado do poço e acompanhadas durante sete dias em estufa sem CO_2 e com temperatura de aproximadamente 30°C . Quando o efeito foi confirmado, a amostra foi coletada e transferida para tubos cônicos de 15 mL e estocadas a -20°C e, posteriormente, seguiu para as etapas de identificação. Quando o efeito não foi confirmado, a amostra foi descartada.

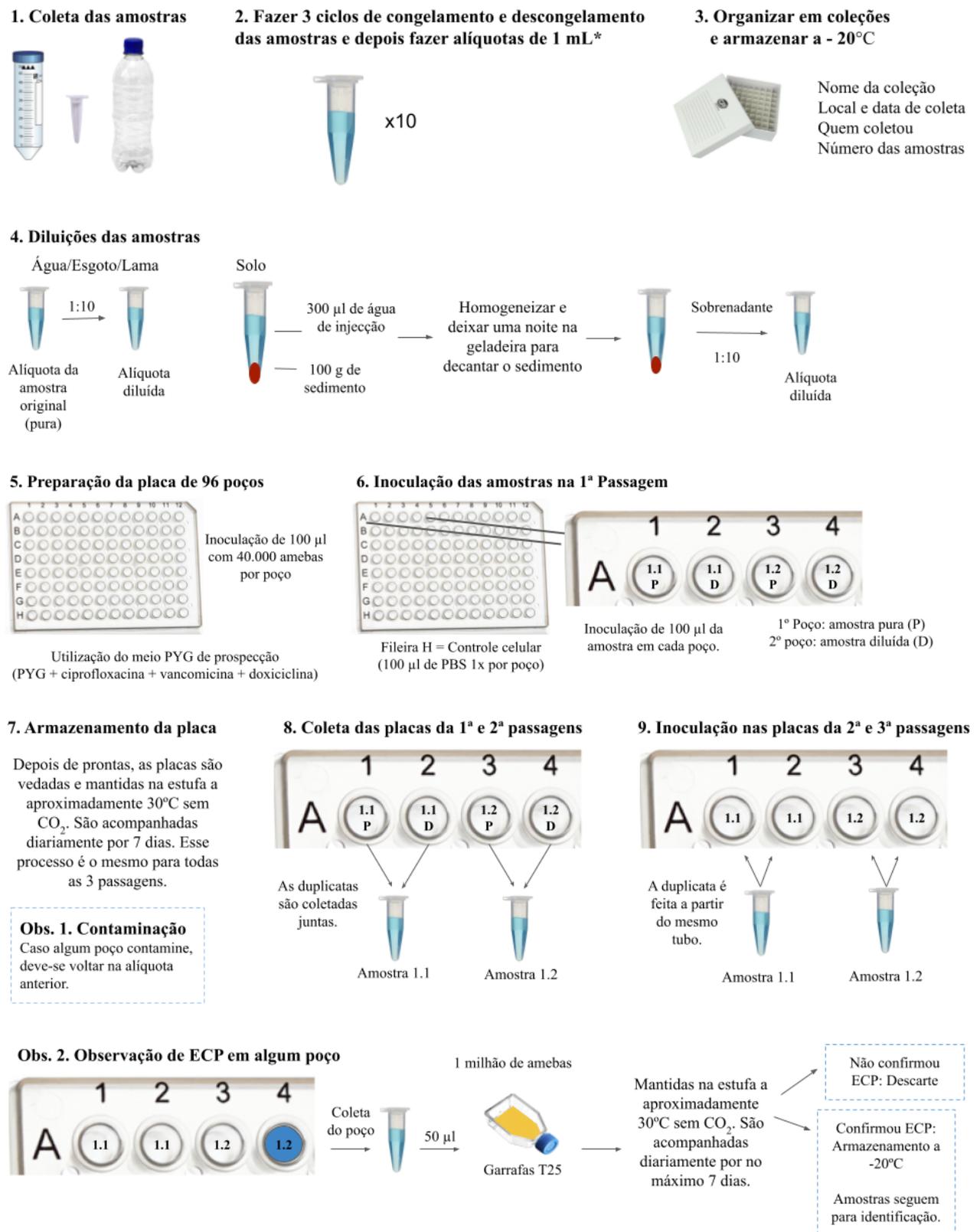


Figura 40. Esquema representando as etapas da técnica de isolamento. *Para amostras de lama: primeiro são armazenadas na geladeira por uma noite para que ocorra a decantação do sedimento, posteriormente seu sobrenadante é alíquotado.

5.2- Preparação do Pool-Semente

Para a realização dos experimentos propostos, foi necessário multiplicar e titular os novos isolados virais. A preparação do pool-semente foi feita a partir de cada uma das amostras coletadas após a confirmação do efeito citopático (ECP). Foi inoculado 500 µl de cada uma dessas amostras em uma garrafa de cultivo T-25 (Kasvi, Brasil) contendo 1×10^6 amebas em meio PYG. A garrafa foi incubada a 30°C e monitorada diariamente até ser observado o aparecimento do ECP. Após a observação do ECP, 2 mL foram coletados e armazenados em criotubos de 2 mL, sendo 1 mL armazenado a -20°C e 1 mL a -70°C. O conteúdo restante (3 mL) foi inoculado em uma garrafa de cultivo T-175 (Kasvi, Brasil) contendo 7×10^6 amebas e, novamente, foi monitorada diariamente. Ao ser observado o efeito citopático, o conteúdo da garrafa foi coletado e aliquoteado em criotubos de 1,5 mL. Para o estoque de pool-semente, foram armazenados 5 mL a -20°C e 5 mL a -70°C.

5.3- Titulação

Para a realização do próximo passo, preparação das amostras para microscopia, foi necessário primeiro titular cada um dos pool-semente. Para realizar a titulação foi utilizado o método de diluição limitante (end point) descrito por Reed e Muench (1938).

Primeiramente, foram preparadas placas de 96 poços (Kasvi, Brasil) contendo 100 µl com 4×10^4 células de *A. castellanii* em meio PYG por poço. Após dois ciclos de congelamento e descongelamento das amostras virais, foi realizada a diluição dessas amostras em PBS 1x na razão de 1:10, indo de 10^{-1} a 10^{-11} . Após a diluição, foi inoculado 100 µL por poço na placa com as células já aderidas na monocamada, sendo que cada diluição foi inoculada em 8 poços e 8 poços foram utilizados para controle celular, com a adição de 100 µl de PBS 1x por poço. A placa foi vedada e mantida em estufa a temperatura de aproximadamente 30°C por cerca de quatro dias, podendo variar de acordo com o vírus. No último dia foi realizada a leitura da titulação, através da observação do efeito citopático, e os cálculos para obtenção do título viral em TCID₅₀/mL foram realizados conforme descrito por Reed e Muench em 1938.

5.4- Identificação dos novos isolados

Para a identificação dos novos isolados foi utilizada principalmente a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão, a qual permite a observação da morfologia interna da partícula e das fábricas virais em células infectadas. Para algumas amostras, a identificação foi complementada com a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, que permite a análise da morfologia externa da partícula e das células infectadas.

5.4.1- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi adicionado inicialmente $1,5 \times 10^7$ células de *Acanthamoeba castellanii* em uma garrafa de cultura celular T-75 (Kasvi, Brasil) ou em uma garrafa de cultura de vidro (300 cm²). As células foram infectadas com os novos vírus isolados durante este trabalho com uma M.O.I. de 0,01 e mantidas em estufas sem CO₂ a temperatura de aproximadamente 30°C até o aparecimento do efeito citopático. Após a observação do efeito citopático, o conteúdo da garrafa foi coletado em um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 1308 x g (Sorvall RT6000B) por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 5 mL de tampão fosfato monossódico 0,1 M (Preparado no Laboratório de Vírus - Anexos) e o conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e centrifugado novamente a 1308 x g (Sorvall RT6000B) por 10 minutos. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 5 mL de tampão fosfato monossódico 0,1 M e centrifugado novamente a 1308 x g (Sorvall RT6000B) por 10 minutos. Após as lavagens o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL do fixador composto por glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato monossódico 0,1 M (obtido pronto do Centro de Microscopia da UFMG - CM) e mantido em um homogeneizador durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o período de incubação com o fixador, o conteúdo do tubo cônico foi centrifugado a 145 x g (Sorvall RT6000B) por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com 1 mL de tampão fosfato monossódico 0,1 M, o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi novamente centrifugado, a 0,8 x g (Eppendorf 5415R) por 10 minutos. Após essa última centrifugação o material estava pronto e foi corretamente identificado e armazenado na geladeira até o momento do envio para o Centro de Microscopia da UFMG, onde posteriormente foi realizada a fixação com 2% de tetróxido de ósmio, a incorporação em resina EPON e a realização de secções ultrafinas. As análises das imagens foram realizadas através do microscópio eletrônico de transmissão (FEI SpiritBiotwin 120 kV).

5.4.2- Microscopia Eletrônica de Varredura

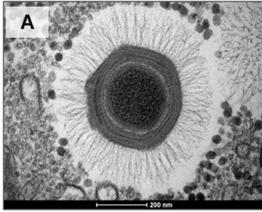
Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi adicionado inicialmente 1×10^6 células de *Acanthamoeba castellanii* em uma garrafa de cultura celular T-25 (Kasvi, Brasil) e essas células foram infectadas com os vírus de interesse com uma M.O.I. de 0,01. A garrafa com as células infectadas foi mantida em estufa sem CO₂ e com temperatura de aproximadamente 30°C até o aparecimento do efeito citopático. Após a observação do efeito citopático foi coletado 1,5 mL da suspensão e centrifugado a 9,3 x g (Eppendorf 5415R) por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1x e foi realizada uma nova centrifugação a 9,3 x g (Eppendorf 5415R) por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspensionado em 10 µL de PBS 1x. Esse volume foi espalhado em uma lamínula redonda tratada com poly-L-lisina (obtida pronta do CM) e essa lamínula foi delicadamente acomodada em um dos poços de uma placa de 24 poços (Kasvi, Brasil). Esse material foi fixado com 1,5 mL de uma solução de glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1 M (obtido pronto do CM) por 2 horas. Após o período de fixação, o fixador foi retirado e foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada com 1 mL de tampão cacodilato 0,1 M (obtido pronto do CM). Na terceira lavagem o tampão não foi retirado, a placa foi vedada e mantida na geladeira devidamente identificada até o momento do envio para o Centro de Microscopia da UFMG, onde foi realizado a fixação secundária com tetróxido de ósmio 1% por 1 hora à temperatura ambiente, três lavagens com tampão cacodilato 0,1 M e imersão em ácido tânico a 0,1% por 20 minutos. Após esses processos as amostras foram lavadas novamente com tampão cacodilato e desidratadas utilizando passagens seriadas em soluções de etanol com diferentes concentrações, variando de 35% a 100%. Posteriormente, as amostras passaram por um processo de secagem em ponto crítico utilizando CO₂, foram acomodadas em suportes metálicos (chamados de *stubs*) e por fim, foram metalizadas com uma camada de ouro de 5 nm. As análises das imagens foram realizadas através do microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200 FEG).

5.4.3- Critérios utilizados para a classificação dos grupos virais

A partir das imagens de microscopia, foram utilizadas características morfológicas da partícula e da fábrica viral para definir a qual grupo viral o novo isolado pertence, tendo como

base as características utilizadas nos artigos de descrição para cada um dos grupos.

Mimivírus



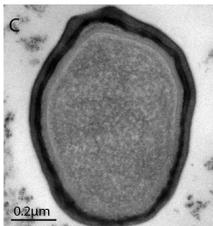
- Simetria pseudo-icosaédrica
- 500 nm de diâmetro
- Circundado por uma camada de fibrilas (125 nm de comprimento)
- Capsídeo formado por camadas proteicas
- Membrana lipídica interna
- Presença do “stargate”
- Fábrica viral elétron-densa no citoplasma celular

Marseillevírus



- Simetria icosaédrica
- Cerca de 250 nm de diâmetro
- Partículas podem ser encontradas isoladas ou agrupadas
- Fábrica viral elétron-luscente no citoplasma celular

Pandoravírus



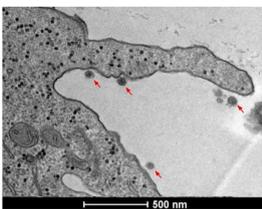
- Formato ovóide
- Cerca de 1 μm de comprimento
- Presença de um ostíolo apical
- Fábrica viral elétron-luscente no citoplasma celular

Pithovírus/Cedratvírus*



- Formato ovóide
- De 600 nm até 1,5 μm de comprimento
- Capsídeo composto por estrias verticais paralelas
- Presença de um ou dois corks apicais, estriados
- Fábrica viral elétron-luscente no citoplasma celular com presença de estruturas amorfas elétron-densas

Yaravírus**



- Simetria icosaédrica
- Cerca de 80 nm de diâmetro
- Fábrica viral elétron-luscente no citoplasma celular

* Devido aos pithovírus e cedratvírus serem muito parecidos morfológicamente e apresentarem características da fábrica viral muito parecidas também, a confirmação desses grupos se dá pelo sequenciamento do genoma.

** Este vírus não havia sido descrito anteriormente. Seu isolamento aconteceu durante o presente trabalho, e sua caracterização foi realizada em conjunto com outros integrantes de nosso laboratório.

6- RESULTADOS

6.1 - Caracterização e descrição das coleções

Neste trabalho foram processadas 641 alíquotas obtidas a partir de 163 amostras coletadas de 10 estados brasileiros: Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, tendo sido organizadas em 23 coleções (Tabela 2), cujas localizações exatas são mostradas no mapa a seguir, Figura 41. Foram realizadas coletas de diferentes tipos de amostras (água doce, água salgada, esgoto, lama e solo) originadas dos diferentes biomas brasileiros (Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia, Pantanal, Caatinga e Pampa) (Tabela 2).



Figura 41. Mapa com a distribuição das coleções. Localização de cada uma das coleções baseada em suas coordenadas geográficas. Os biomas brasileiros são representados por cores diferentes, conforme legenda da figura.

Tabela 2. Coleções de Amostras. As Informações sobre o bioma, local, tipo e coordenadas da coleta de cada uma das amostras estão organizadas em Coleções.

Amostra	Alíquotas	Tipo	Coordenadas
Coleção: Pantanal Local: Pantanal - MS Bioma: Pantanal			
P1	1	Água doce	18°59'60.0"S, 57°36'59.9"W
P2	1	Água doce	18°59'60.0"S, 57°36'59.9"W
P3	1	Solo	18°59'60.0"S, 57°36'59.9"W
P4	1	Solo	18°59'60.0"S, 57°36'59.9"W
Coleção: Serra do Cipó 1 Local: Serra do Cipó - MG Bioma: Cerrado			
17	1	Água doce	19°20'54.1"S, 43°36'34.7"W
22a	1	Água doce	19°20'54.1"S, 43°36'34.7"W
28	1	Água doce	19°20'50.8"S, 43°36'35.5"W
31	1	Água doce	19°20'50.8"S, 43°36'35.5"W
40	1	Água doce	19°20'50.8"S, 43°36'35.5"W
Coleção: Lagoa da Pampulha Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata Atlântica			
22	22.1 a 22.10	Esgoto	19°50'18.3"S, 43°59'40.2"W
23	23.1 a 23.10	Lama	19°51'39.0"S, 43°59'50.2"W
24	24.1 a 24.10	Esgoto	19°50'43.9"S, 43°59'56.6"W
25	25.1 a 25.10	Esgoto	19°50'43.9"S, 43°59'56.6"W
26	26.1 a 26.10	Esgoto	19°51'39.0"S, 43°59'50.2"W
Coleção: Escola de Veterinária da UFMG Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata Atlântica			
27	27.1 a 27.10	Água doce	19°52'13.0"S, 43°58'14.9"W
28	28.1 a 28.5	Água doce	19°52'13.0"S, 43°58'14.9"W
29	29.1 a 29.7	Água doce	19°52'13.0"S, 43°58'14.9"W
Coleção: Esmeraldas Local: Esmeraldas - MG Bioma: Cerrado			
33	33.1 a 33.10	Água doce	19°45'12.0"S, 44°18'55.7"W
34	34.1 a 34.10	Água doce	19°45'12.0"S, 44°18'55.7"W
Coleção: Piauí 1 Local: Teresina - PI Bioma: Cerrado			
35	35.1 a 35.10	Esgoto	5°3'49.62"S, 42°48'23.45"W
36	36.1 a 36.10	Esgoto	5°3'49.62"S, 42°48'23.45"W
Coleção: Maranhão Local: São João dos Patos - MA Bioma: Cerrado			
37	37.1 a 37.10	Água doce	6°30'05.8"S, 43°42'26.6"W
38	38.1 a 38.10	Água doce	6°30'14.7"S, 43°42'25.6"W
39	39.1 a 39.10	Água doce	6°30'06.4"S, 43°41'39.6"W
40	40.1 a 40.10	Água doce	6°29'55.4"S, 43°42'20.7"W
Coleção: Bahia Local: Salvador - BA Bioma: Mata Atlântica			
41	41.1 a 41.10	Água salgada	12°55'44.7"S, 38°31'12.3"W
42	42.1 a 42.10	Água doce	12°34'39.6"S, 38°00'50.1"W
43	43.1 a 43.10	Água doce	12°58'53.7"S, 38°30'16.8"W
44	1	Água doce	12°58'22.2"S, 38°30'40.4"W
Coleção: Goiás Local: Alto Paraíso - GO Bioma: Cerrado			
45	45.1 a 45.10	Água doce	14°06'09.6"S, 47°29'46.4"W
Coleção: Amazonas Local: Borba e Manaus - AM Bioma: Amazônia			
46	46.1 a 46.10	Esgoto	4°23'15.8"S, 59°35'47.9"W
47	47.1 a 47.10	Água doce	3°08'01.3"S, 60°01'02.0"W
Coleção: Rio Grande do Sul 1 Local: Porto Alegre - RS Bioma: Pampa			
48	48.1 a 48.10	Água doce	30°02'01.6"S, 51°14'28.8"W
Coleção: Lagoa Santa Local: Lagoa Santa - MG Bioma: Cerrado			
49	49.1 a 49.10	Esgoto	19°38'24.7"S, 43°54'07.5"W
50	50.1 a 50.10	Esgoto	19°38'12.1"S, 43°53'16.4"W
51	51.1 a 51.10	Água doce	19°38'49.3"S, 43°54'38.2"W
52	52.1 a 52.10	Água doce	19°38'46.5"S, 43°54'43.4"W
Coleção: Córrego Liberdade Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata Atlântica			
53	53.1 a 53.10	Esgoto	19°51'41.2"S, 43°57'27.8"W
Coleção: São Paulo Local: Campos do Jordão - SP Bioma: Mata Atlântica			
54	54.1 a 54.10	Água doce	22°42'59.2"S, 45°34'58.0"W

Coleção: Mato Grosso do Sul Local: Bonito - MS Bioma: Cerrado			
55	55.1 a 55.10	Água doce	21°24'58.7"S, 56°27'25.4"W
56	56.1 a 56.9	Água doce	21°29'23.7"S, 56°26'22.0"W
57	57.1 a 57.10	Água doce	21°29'08.3"S, 56°27'25.3"W
58	58.1 a 58.10	Água doce	21°08'36.3"S, 56°36'01.3"W
59	59.1 a 59.10	Água doce	21°08'28.1"S, 56°28'39.7"W
60	60.1 a 60.10	Água doce	21°06'23.8"S, 56°31'49.2"W
61	61.1 a 61.9	Água doce	21°15'13.3"S, 56°32'16.5"W
62	62.1 a 62.10	Água doce	21°08'37.7"S, 56°34'30.0"W
63	63.1 a 63.9	Água doce	21°24'58.7"S, 56°27'25.4"W
64	64.1 a 64.10	Água doce	21°08'37.7"S, 56°34'30.0"W
65	65.1 a 65.10	Água doce	21°15'13.3"S, 56°32'16.5"W
66	66.1 a 66.10	Água doce	20°44'07.5"S, 56°44'03.5"W
67	67.1 a 67.9	Água doce	21°15'13.3"S, 56°32'16.5"W
Coleção: Piauí 2 Local: Cajueiro da Praia - PI Bioma: Caatinga			
68	68.1 a 68.10	Água salgada	2°54'34.03"S, 41°24'50.18"W
69	69.1 a 69.10	Água salgada	2°54'34.03"S, 41°24'50.18"W
Coleção: St. Antônio do Itambé Local: St. Antônio do Itambé - MG Bioma: Mata Atlântica			
70	70.1 a 70.10	Água doce	18°27'53.4"S, 43°18'23.3"W
71	71.1 a 71.10	Água doce	18°27'49.8"S, 43°18'28.0"W
72	72.1 a 72.10	Água doce	18°27'49.8"S, 43°18'28.0"W
Coleção: Santa Catarina Local: Florianópolis - SC Bioma: Mata Atlântica			
73	73.1 a 73.10	Água salgada	27°41'21.5"S, 48°28'56.8"W
74	74.1 a 74.10	Esgoto	27°41'21.5"S, 48°28'56.8"W
75	75.1 a 75.10	Água salgada	27°33'14.9"S, 48°30'47.5"W
76	76.1 a 76.10	Água salgada	27°50'41.4"S, 48°35'35.2"W
Coleção: Rio Grande do Sul 2 Local: Gramado - RS Bioma: Mata Atlântica			
77	77.1 a 77.5	Água doce	29°23'38.3"S, 50°52'37.1"W
Coleção: Serra do Cipó 2 Local: Serra do Cipó - MG Bioma: Cerrado			
83	83.1 a 83.10	Água doce	19°20'53.0"S, 43°36'31.0"W
Coleção: Garrafa de Plástico Local: Não Informado Bioma: Não Informado			
84	84.1 a 84.10	Água doce	Não identificado
85	85.1 a 85.10	Água doce	Não identificado
Coleção: Serra do Cipó 3 Local: Serra do Cipó - MG Bioma: Cerrado			
SC	1 a 10	Água doce	19°22'36"S, 43°35'44"W
SC	11 a 20	Água doce	19°20'53"S, 43°36'31"W
SC	21 a 30	Água doce	19°22'17"S, 43°36'02"W
SC	31 a 45	Água doce	19°20'42"S, 43°36'36"W
SC	46 a 48	Água doce	19°22'45.2"S, 43°34'33.9"W
Coleção: Altamira Local: Altamira - MG Bioma: Cerrado			
Altamira	1 a 50	Água doce	19°30'17.2"S, 43°34'12.0"W

No gráfico A (Figura 42) é possível ver a representatividade de cada uma das coleções em relação ao total, sendo a do Mato Grosso do Sul a mais representativa, contribuindo com 13 amostras e 126 alíquotas, e a do Pantanal a menos representativa, possuindo 4 amostras, sendo que cada amostra era apenas uma alíquota. No gráfico B (Figura 42) é possível ver a representatividade de cada tipo de amostra em relação ao total, sendo a maior parte originada de água doce (459 alíquotas), seguido por, esgoto (110 alíquotas), água salgada (60 alíquotas), lama (10 alíquotas) e solo (2 alíquotas). Finalmente, no gráfico C (Figura 42) podemos ver quais tipos de amostras compõem cada uma das coleções e a sua representatividade dentro da coleção.

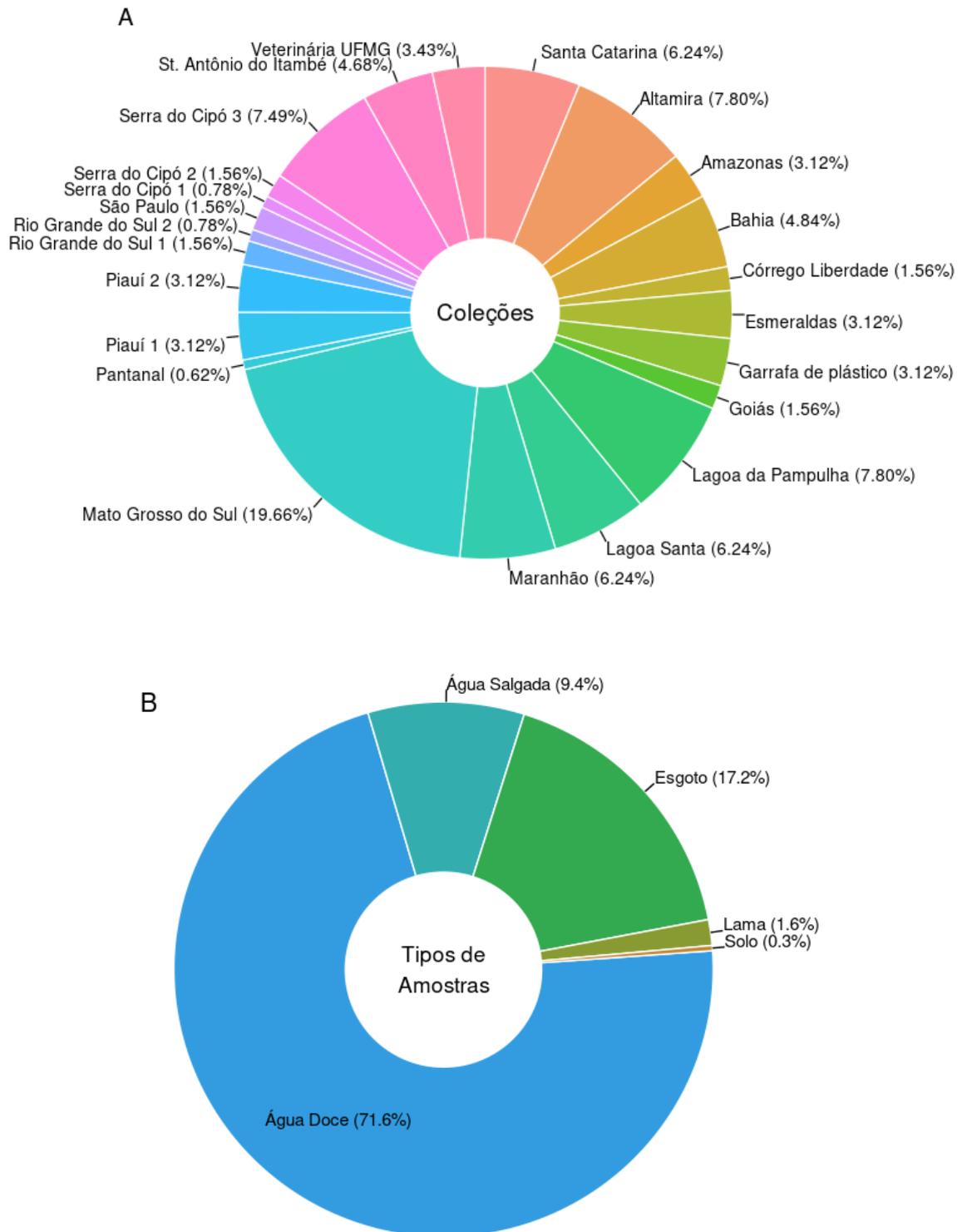


Figura 42. Coleções e tipos de amostras. (A) Representatividade de cada coleção dentro do total de coleções. A coleção do Mato Grosso do Sul é a mais representativa, enquanto a do Pantanal é a menos representativa. **(B)** Representatividade de cada tipo de amostra dentro do total de tipos de amostras, sendo a maior parte de água doce.



Figura 43. Biomas e tipos de amostras. (A) Representatividade de cada bioma dentro do total de biomas. O bioma Cerrado é o mais bem representado, seguido da Mata Atlântica. O menos representado é o do Pantanal. (B) Representatividade de cada tipo de amostra dentro de cada um dos biomas. A Mata Atlântica foi o bioma com maior quantidade de tipos diferentes de amostras.

Como observado, o bioma com maior representatividade foi o Cerrado (57,57%), seguido pela Mata Atlântica (30,89%) e os menos representados foram Pampa (1,56%) e Pantanal (0,62%). O bioma Mata Atlântica foi o único que possuía amostras de lama e foi o que apresentou maior diversidade de tipos de amostras, incluindo também água doce, água

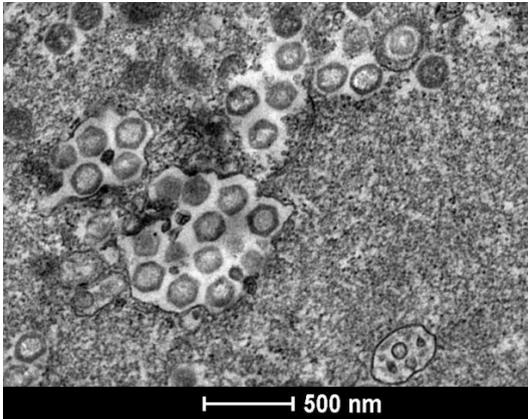
salgada e esgoto. O bioma Pantanal foi o único que possuía amostras de solo.

6.2 - Identificação dos novos isolados

Foram obtidos 67 novos isolados virais, que foram identificados pela análise da morfologia interna da partícula e, em alguns casos, também pela morfologia externa, além da observação da fábrica viral a partir de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura. Todos os novos isolados estão cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob os números A25764F, AC31840, A3DAB3F, ABF23CC e A98DD8C. O painel a seguir mostra uma imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão de cada um dos isolados obtidos neste trabalho e para alguns isolados que nos chamaram atenção, foram obtidas também imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 44).

Coleção: Pantanal

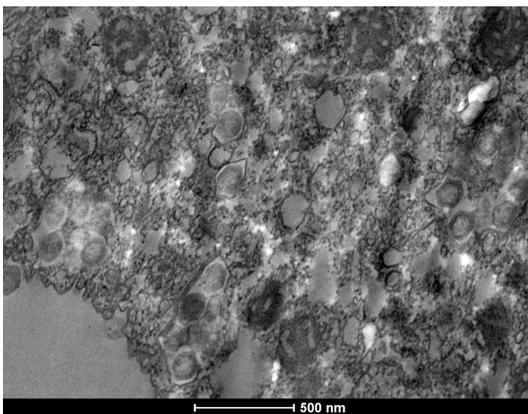
P3 - Marseillevirus (MET)



Barra: 500 nm

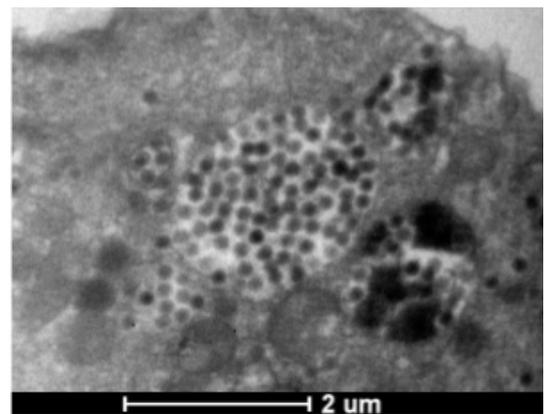
Coleção: Serra do Cipó 1

17 - Marseillevirus (MET)



Barra: 500 nm

22a - Marseillevirus (MET)



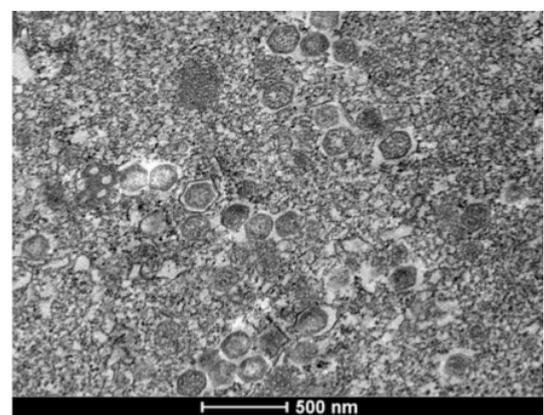
Barra: 2 μm

28 - Marseillevirus (MET)



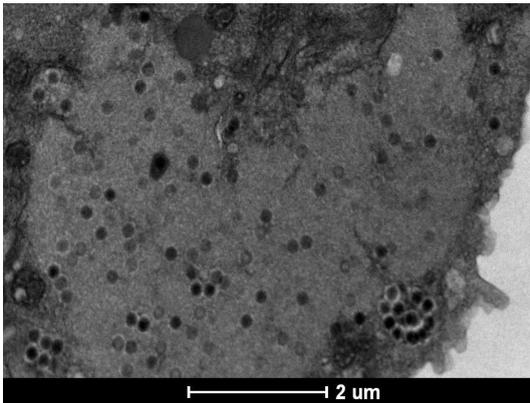
Barra: 100 nm

31 - Marseillevirus (MET)



Barra: 500 nm

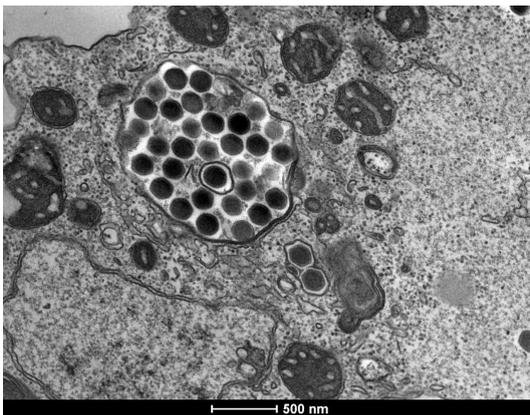
40 - Marseillevirus (MET)



Barra: 2 μm

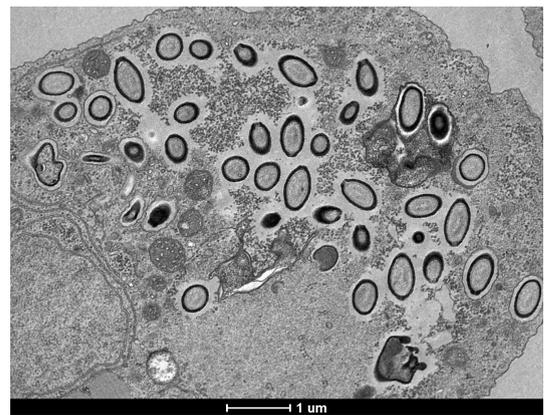
Coleção: Lagoa da Pampulha

22.2 - Marseillevirus (MET)



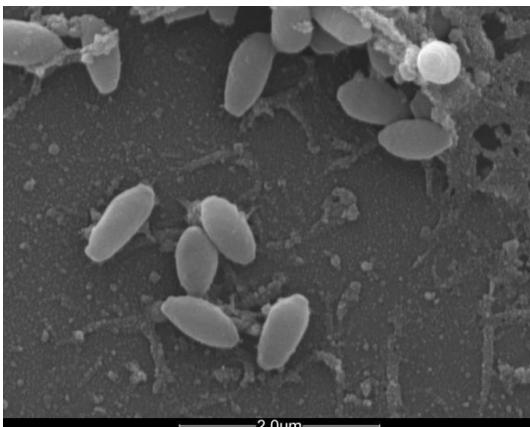
Barra: 500 nm

22.3 - Cedratvirus (MET)



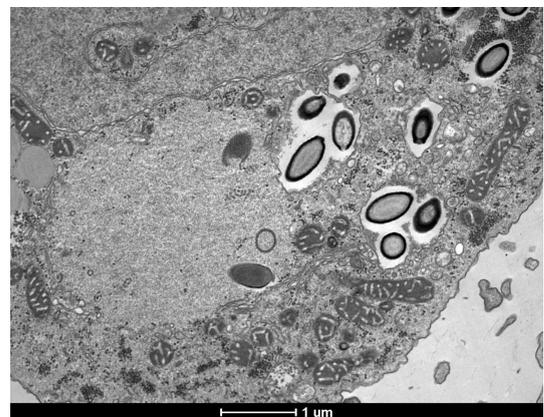
Barra: 1 μm

22.3 - Cedratvirus (MEV)



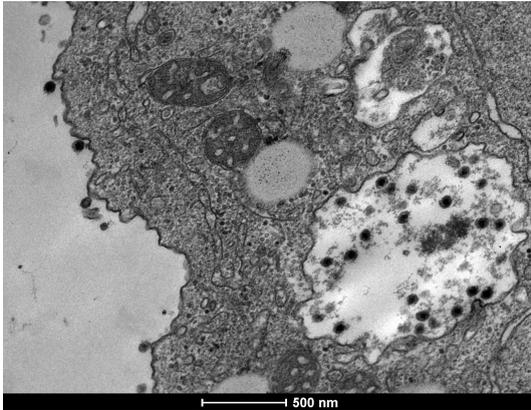
Barra: 2 μm

22.9 - Cedratvirus (MET)



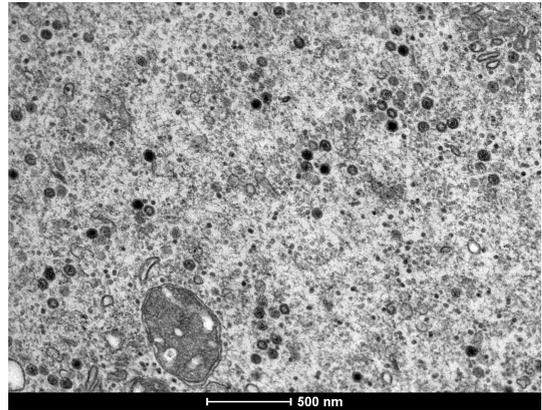
Barra: 1 μm

23.2 - Yaravírus (MET)



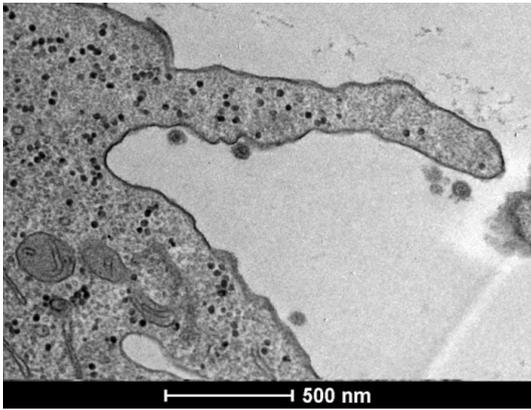
Barra: 500 nm

23.4 - Yaravírus (MET)



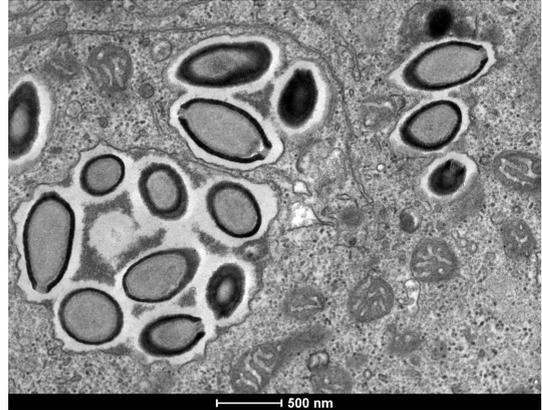
Barra: 500 nm

23.5 - Yaravírus (MET)



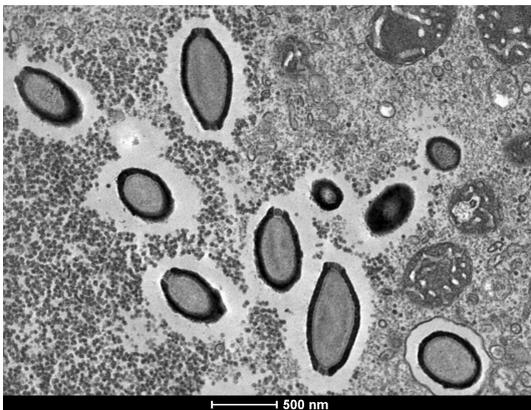
Barra: 500 nm

24.5 - Cedratvírus (MET)



Barra: 500 nm

24.7 - Cedratvírus (MET)



Barra: 500 nm

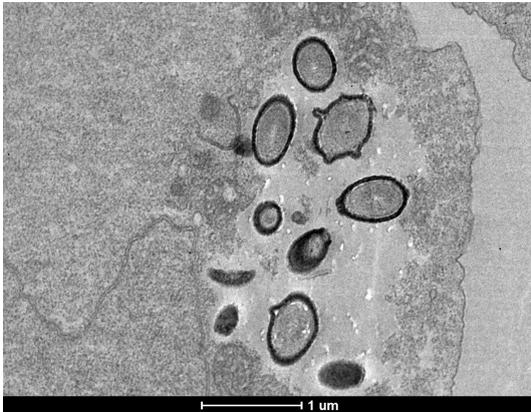
24.7 - Cedratvírus (MEV)



Barra: 5 μm

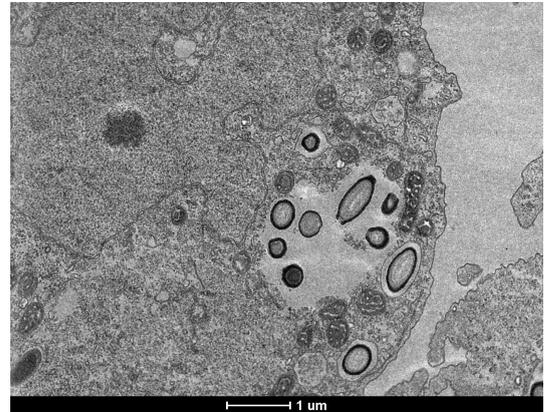
Coleção: Escola de Veterinária da UFMG

27.5 - Cedratvírus (MET)



Barra: 1 μm

27.7 - Cedratvírus (MET)



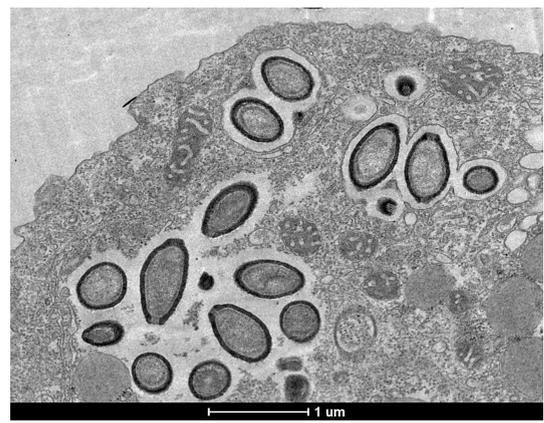
Barra: 1 μm

27.7 - Cedratvírus (MEV)



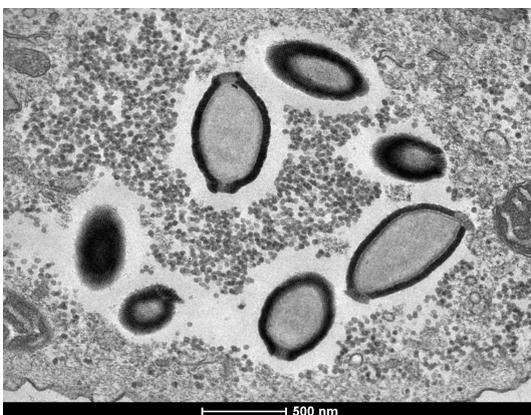
Barra: 5 μm

27.8 - Cedratvírus (MET)



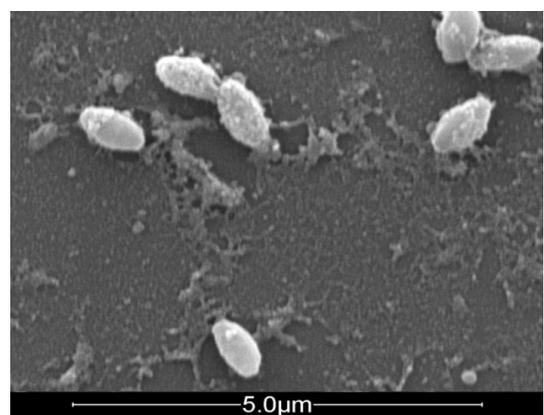
Barra: 1 μm

27.9 - Cedratvírus (MET)

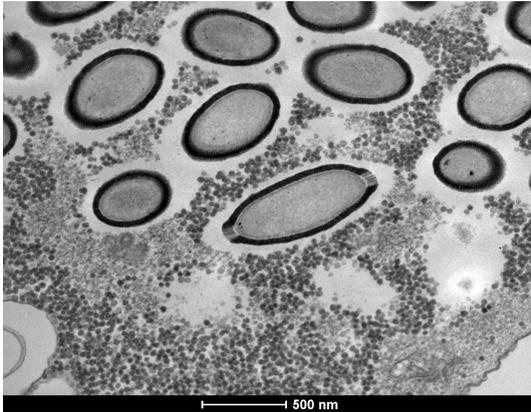


Barra: 500 nm

27.9 - Cedratvírus (MEV)



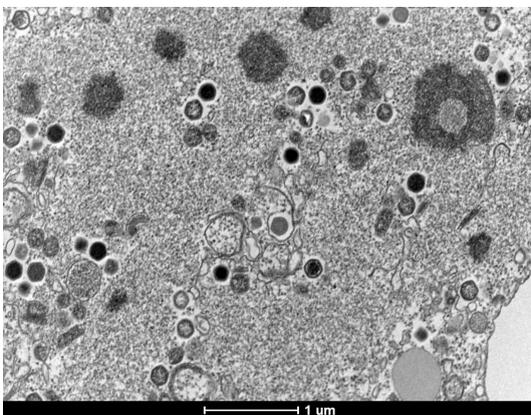
Barra: 5 μm

27.10 - Cedratvírus (MET)

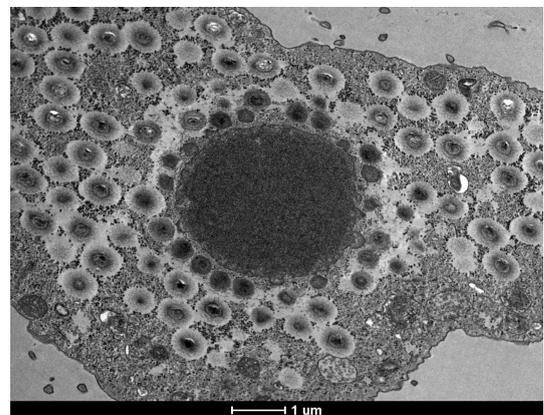
Barra: 500 nm

Coleção: Piauí 1**36.1 - Mimivírus (MET)**

Barra: 200 nm

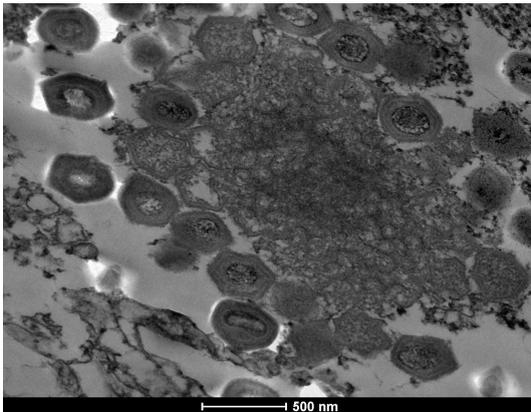
Coleção: Maranhão**37.1 - Marseillevírus (MET)**

Barra: 1 μm

39.3 - Mimivírus (MET)

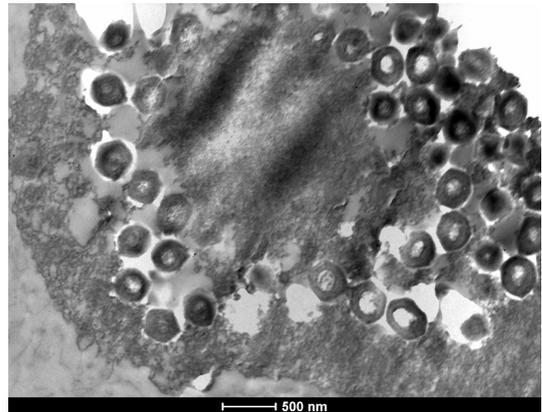
Barra: 1 μm

39.9 - Mimivírus (MET)



Barra: 500 nm

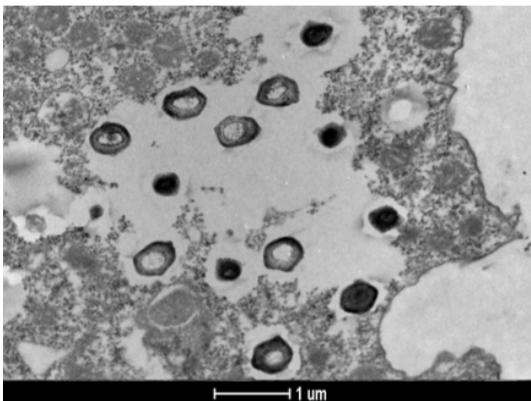
39.10 - Mimivírus (MET)



Barra: 500 nm

Coleção: Bahia

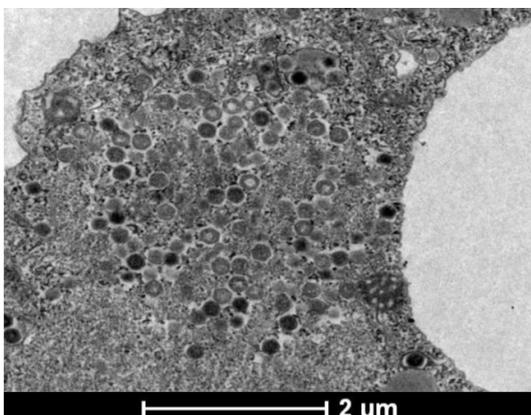
43.3 - Mimivírus (MET)



Barra: 1 μm

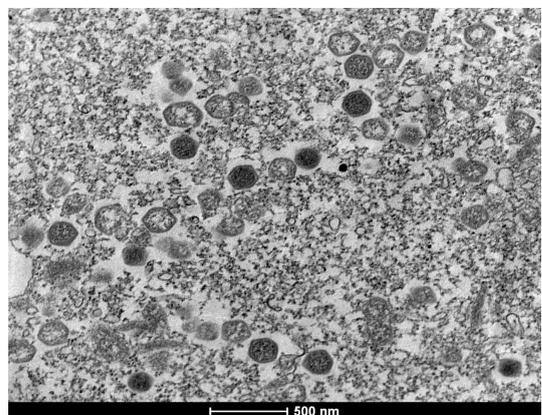
Coleção: Rio Grande do Sul 1

48.2 - Marseillevírus (MET)

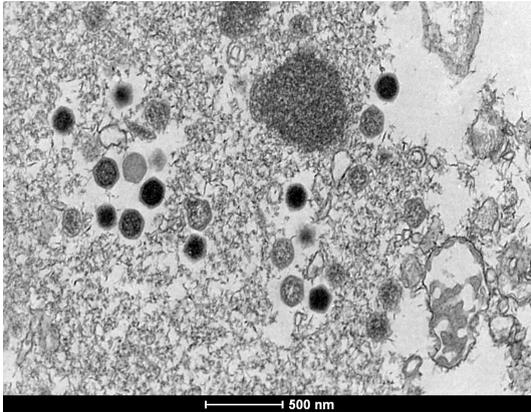
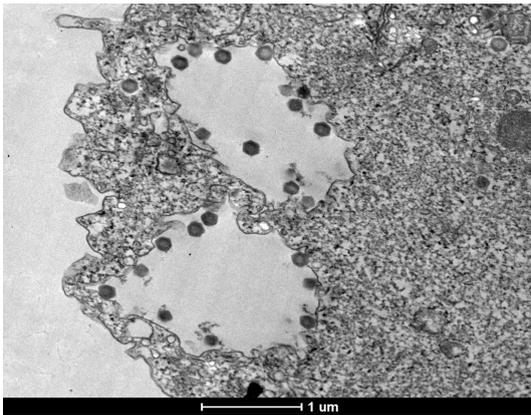
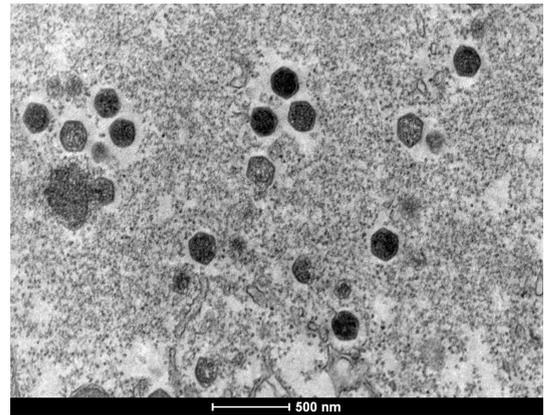
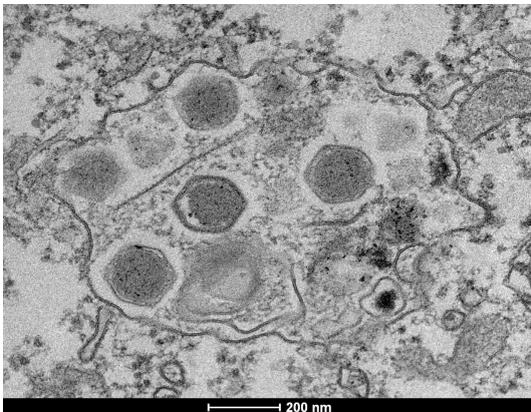


Barra: 2 μm

48.4 - Marseillevírus (MET)

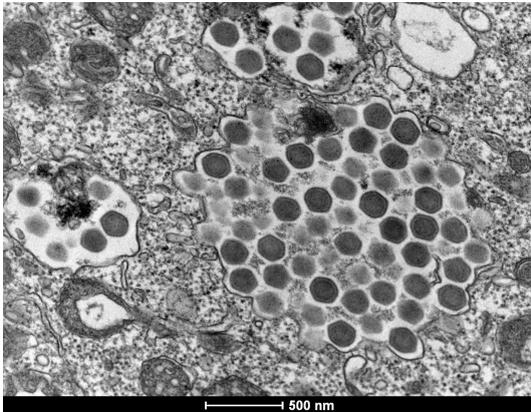


Barra: 500 nm

48.9 - Marseillevírus (MET)**Barra: 500 nm****Coleção: Córrego Liberdade****53.2 - Marseillevírus (MET)****Barra: 1 μm****53.6 - Marseillevírus (MET)****Barra: 500 nm****53.8 - Marseillevírus (MET)****Barra: 200 nm**

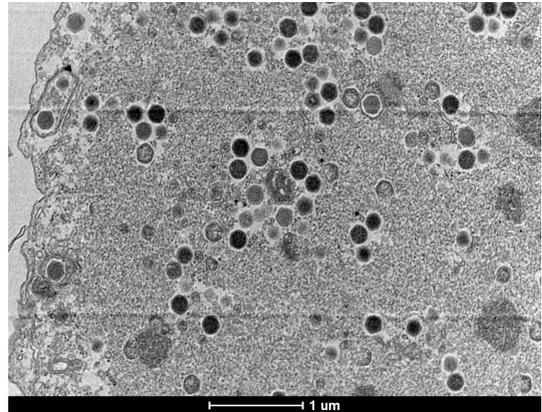
Coleção: Mato Grosso do Sul

55.3 - Marseillevírus (MET)



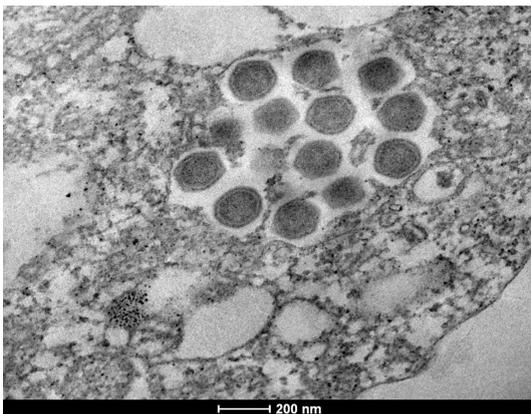
Barra: 500 nm

55.6 - Marseillevírus (MET)



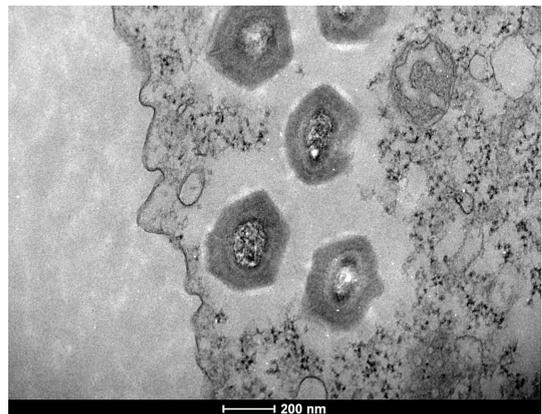
Barra: 1 μm

56.3 - Marseillevírus (MET)



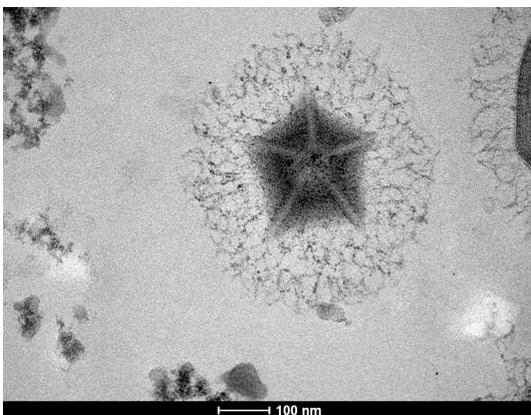
Barra: 200 nm

57.2 - Mimivírus (MET)



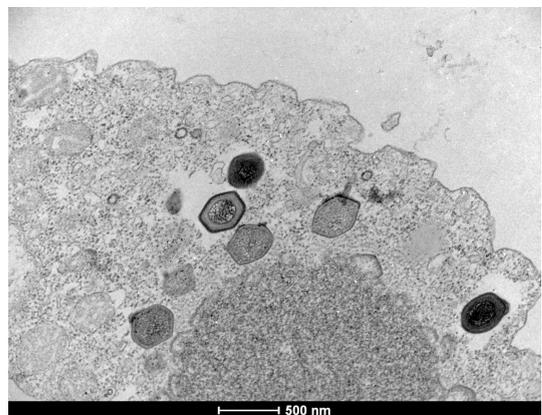
Barra: 200 nm

57.9 - Mimivírus (MET)



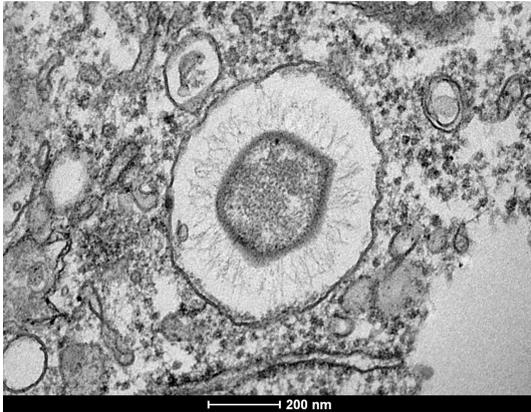
Barra: 100 nm

58.5 - Mimivírus (MET)



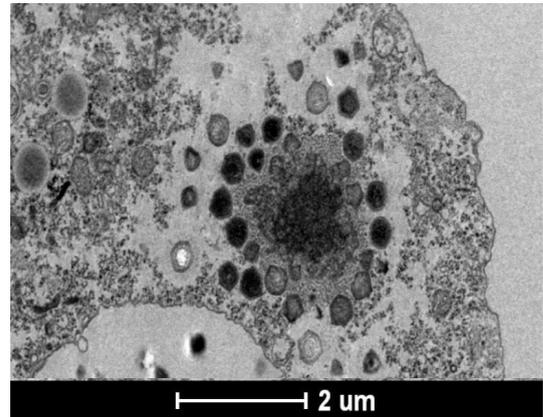
Barra: 500 nm

58.7 - Mimivírus (MET)



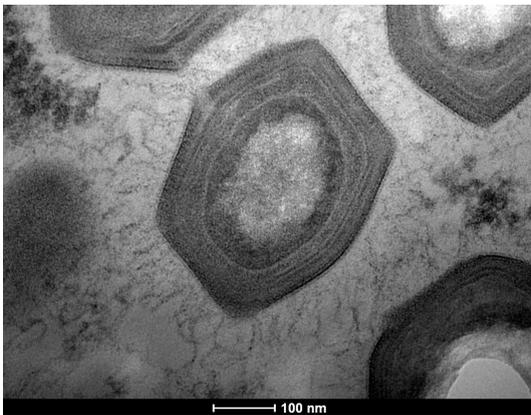
Barra: 200 nm

59.9 - Mimivírus (MET)



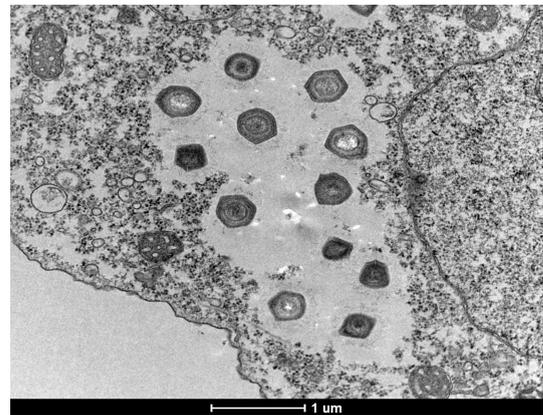
Barra: 2 μm

62.3 - Mimivírus (MET)



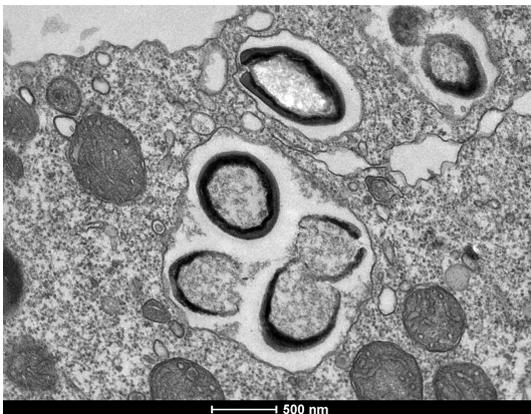
Barra: 100 nm

62.9 - Mimivírus (MET)



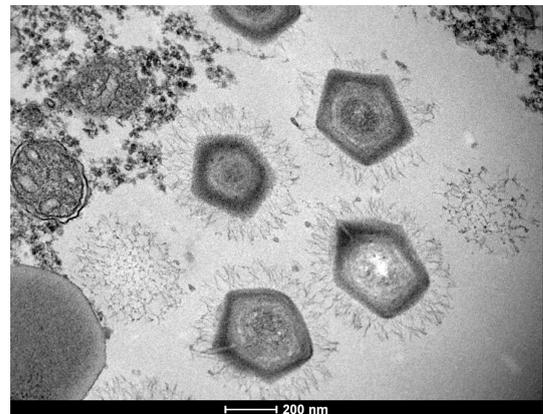
Barra: 1 μm

63.9 - Pandoravírus (MET)

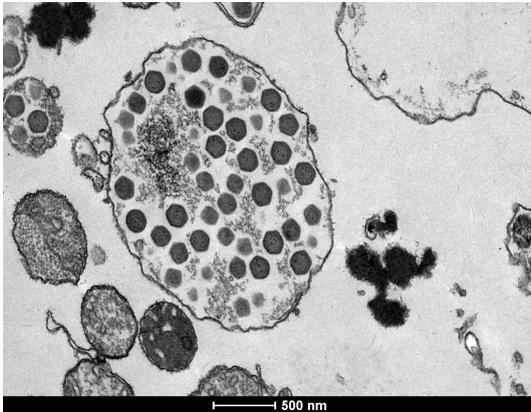
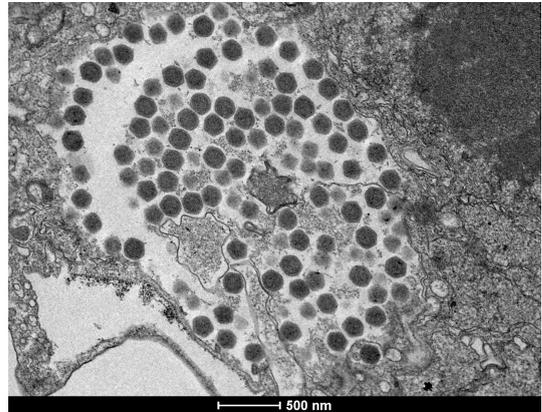
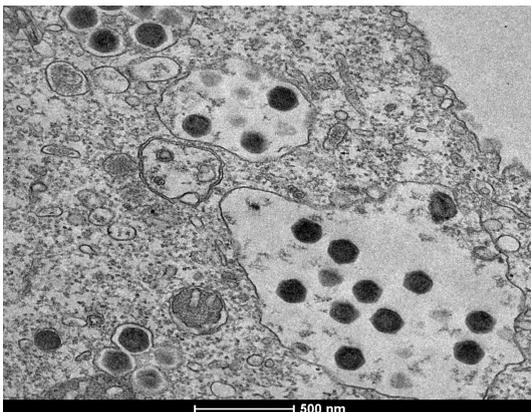
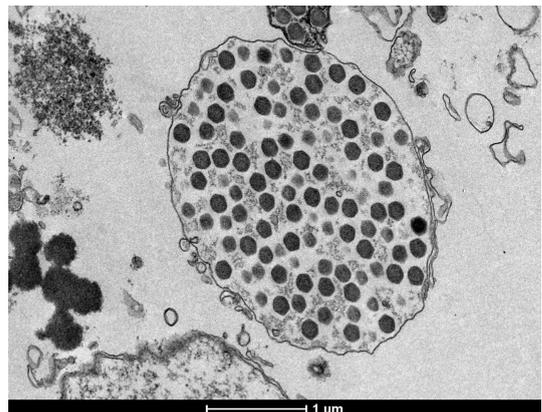
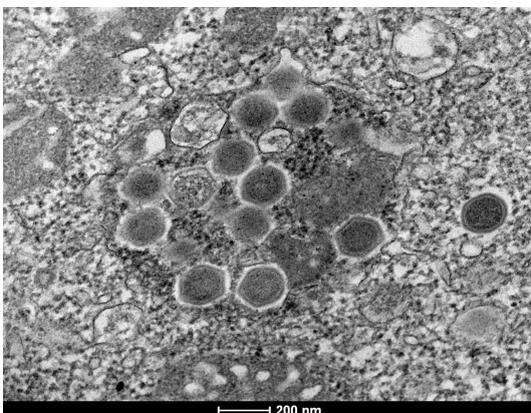
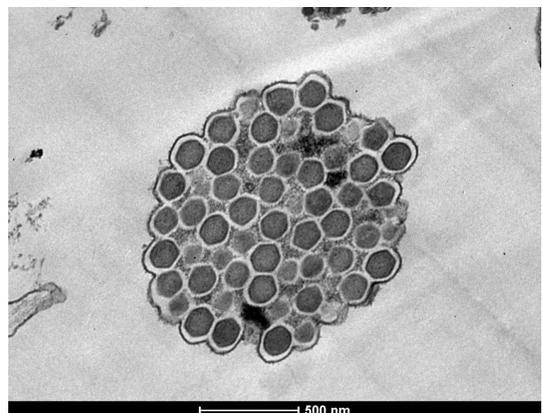


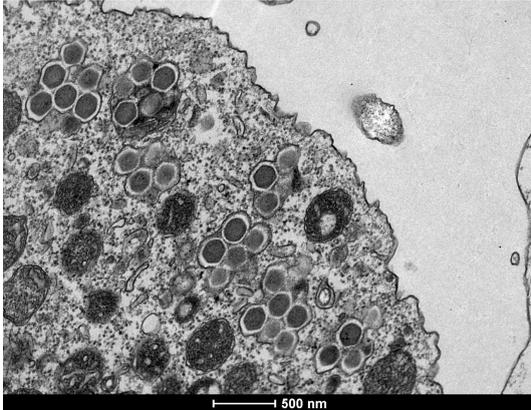
Barra: 500 nm

64.4 - Mimivírus (MET)

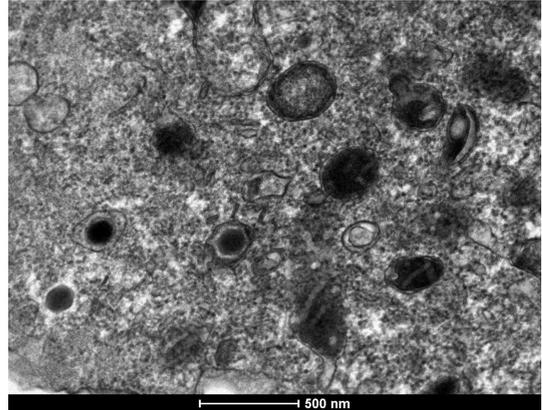


Barra: 200 nm

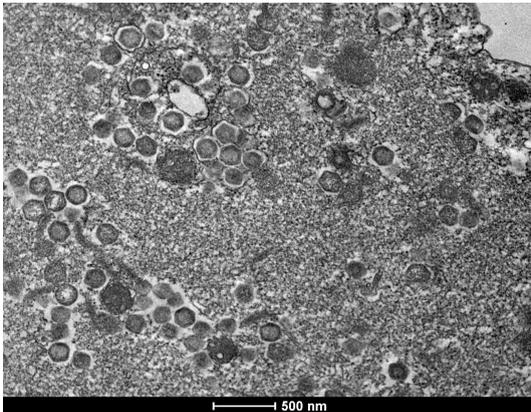
Coleção: Piauí 2**68.4 - Marseillevírus (MET)****Barra: 500 nm****68.5 - Marseillevírus (MET)****Barra: 500 nm****68.7 - Marseillevírus (MET)****Barra: 500 nm****69.2 - Marseillevírus (MET)****Barra: 1 μm****69.3 - Marseillevírus (MET)****Barra: 200 nm****69.4 - Marseillevírus (MET)****Barra: 500 nm**

69.5 - *Marseillevirus* (MET)

Barra: 500 nm

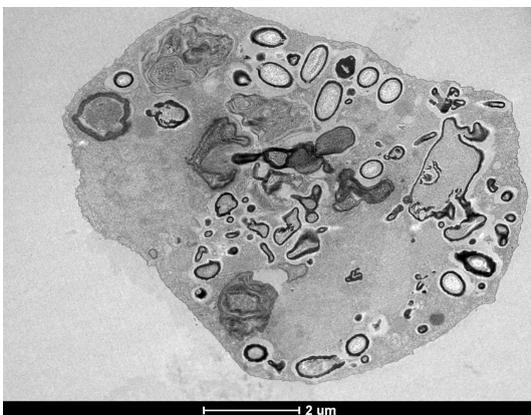
69.8 - *Marseillevirus* (MET)

Barra: 500 nm

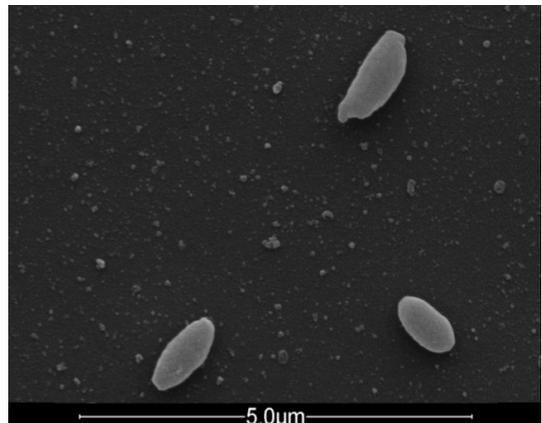
69.9 - *Marseillevirus* (MET)

Barra: 500 nm

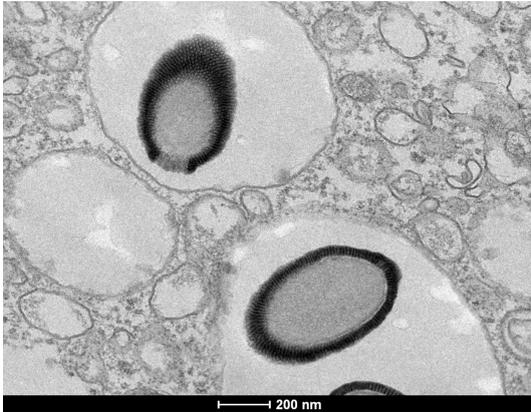
Coleção: Serra do Cipó 2

83.1 - *Pithoviridae*-like (MET)

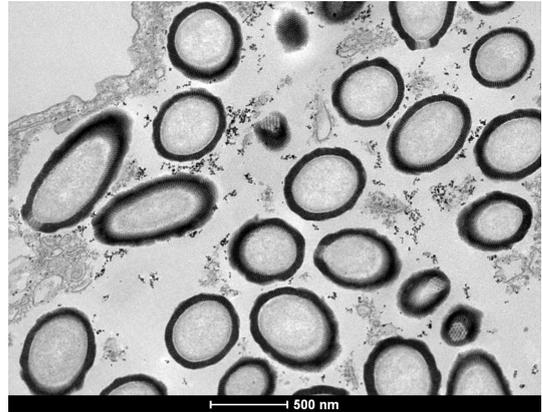
Barra: 2 μm

83.1 - *Pithoviridae*-like (MEV)

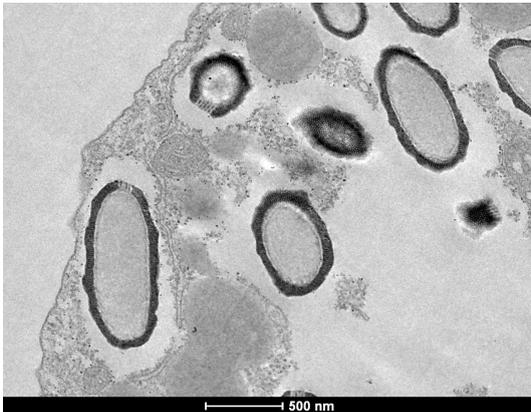
Barra: 5 μm

83.2 - *Pithoviridae*-like (MET)

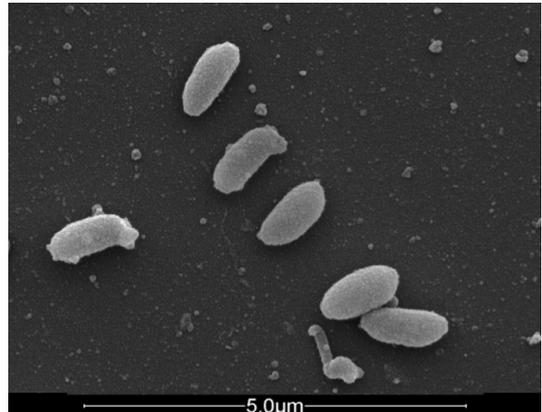
Barra: 200 nm

83.4 - *Pithoviridae*-like (MET)

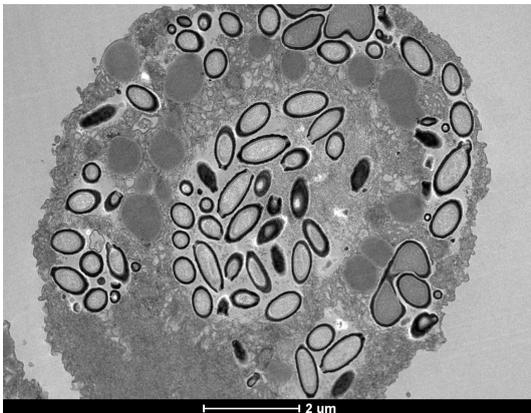
Barra: 500 nm

83.5 - *Pithoviridae*-like (MET)

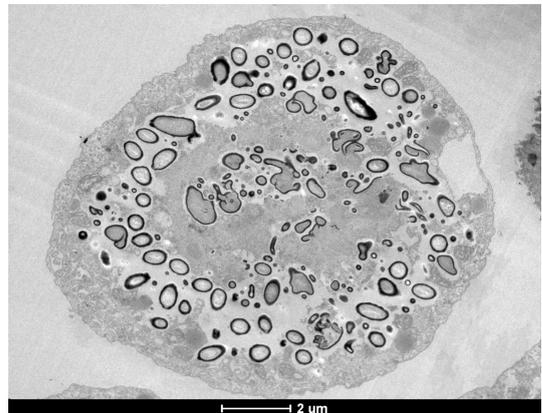
Barra: 500 nm

83.5 - *Pithoviridae*-like (MEV)

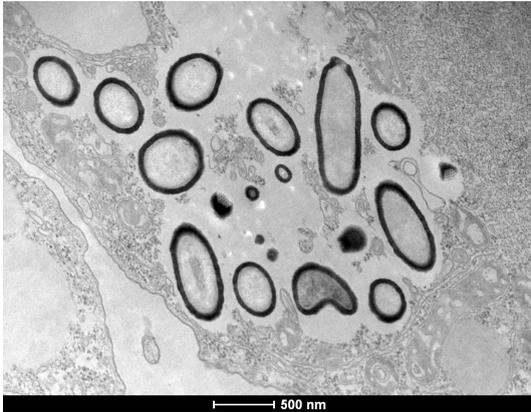
Barra: 5 μm

83.6 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 2 μm

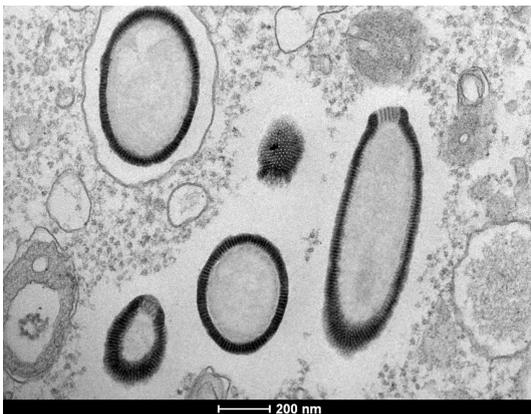
83.9 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 2 μm

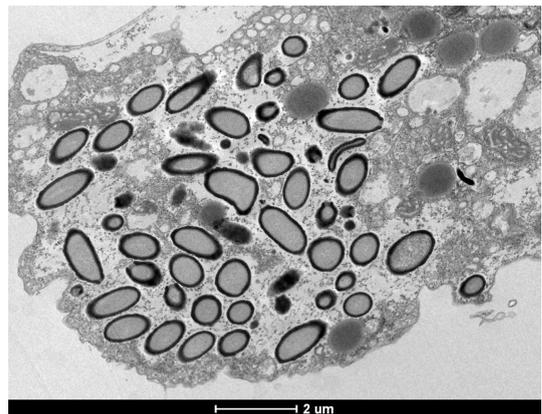
83.10 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 500 nm

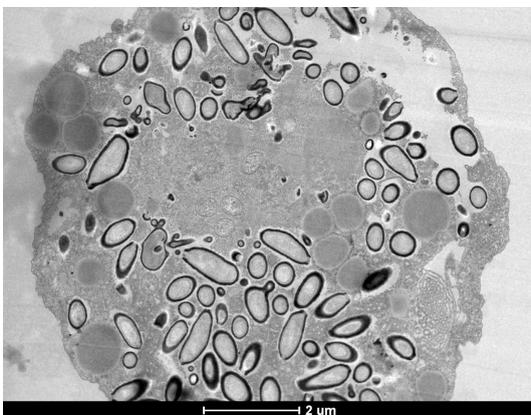
Coleção: Garrafa de plástico

84.3 - *Pithoviridae*-like (MET)

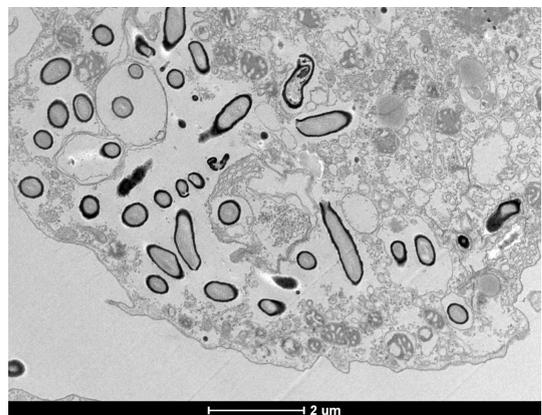
Barra: 200 nm

84.4 - *Pithoviridae*-like (MET)

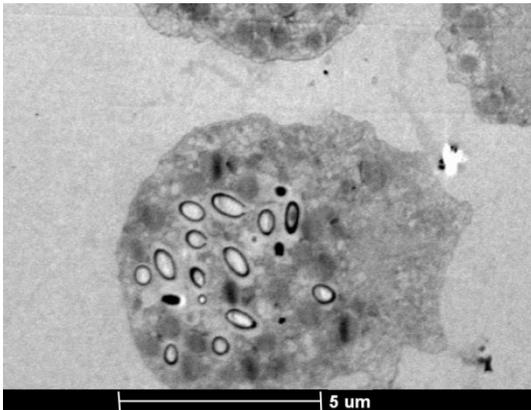
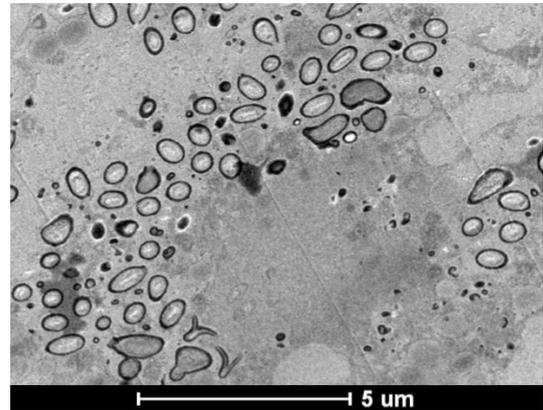
Barra: 2 μm

84.5 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 2 μm

84.6 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 2 μm

85.3 - *Pithoviridae*-like (MET)Barra: 5 μm 85.4 - *Pithoviridae*-like (MET)Barra: 5 μm 85.6 - *Pithoviridae*-like (MET)

Barra: 500 nm

Coleção: Altamira

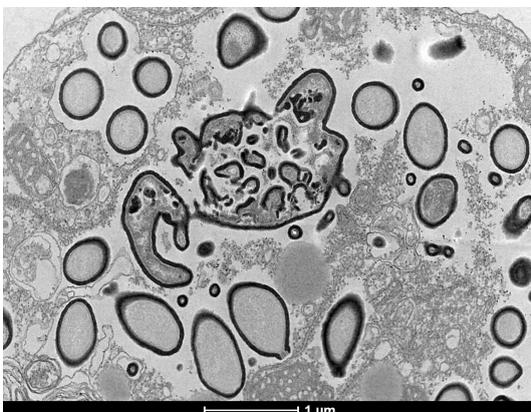
Alta47 - *Pithoviridae*-like (MET)Barra: 1 μm

Figura 44. Painel com imagens de MET e MEV de cada um dos isolados obtidos neste trabalho. O painel está organizado por coleções e foi indicado o grupo ao qual cada vírus pertence.

Dos 67 novos isolados (Figura 45) obtivemos 1 pandoravírus, 13 mimivírus, 26 marseillevírus, 9 cedratvírus, 15 *pithoviridae*-like e os outros 3 isolados merecem destaque pois se trata de um vírus completamente novo, que foi chamado de Yaravírus (Figura 44 - Isolados 23.2, 23.4 e 23.5).

Os Yaravírus foram isolados durante a realização deste trabalho a partir de co-cultura com a ameba de vida livre *A. castellanii*. A caracterização desse vírus por Boratto e colaboradores em 2020 demonstrou que o Yaravírus é diferente dos vírus gigantes de amebas isolados anteriormente. Esse novo vírus apresenta um capsídeo icosaédrico com cerca de 80 nm, bem menor do que os demais vírus de amebas descritos até então. Além de um tamanho menor, seu genoma também é relativamente pequeno, composto por DNA dupla fita de apenas 44.924 pb, codificando para 74 proteínas. Porém, o que mais chamou atenção nesse novo vírus é que mais de 90% do seu genoma é composto por ORFans, não apresentando similaridade com nenhuma sequência de nenhum organismo presente nos bancos de dados analisados. Além disso, também não foi encontrada nenhuma similaridade para o genoma do Yaravírus dentro de bancos de dados de metagenômica disponíveis até janeiro de 2020. Devido a essas características, ainda não foi possível estabelecer uma classificação taxonômica para os yaravírus.

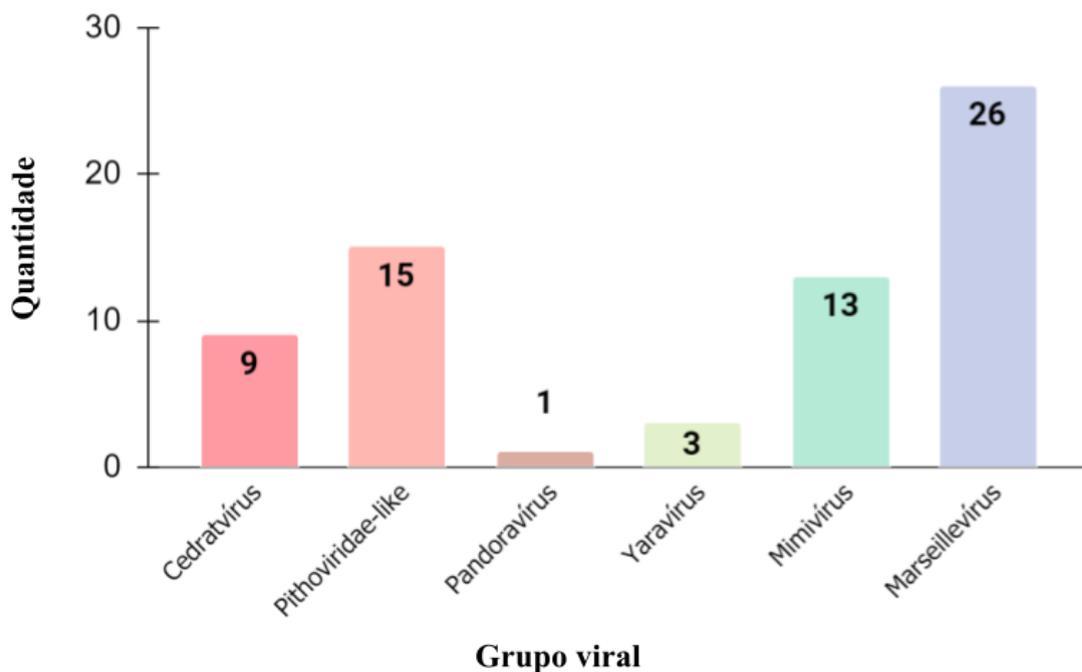


Figura 45. Novos isolados. Gráfico dos 67 novos isolados, mostrando a quantidade isolada de cada grupo viral. A maior quantidade de isolamento foi da família *Marseilleviridae*, enquanto o grupo menos representativo foi dos Pandoravírus. Além disso, foi isolado um vírus completamente novo, o Yaravírus.

6.3 - Caracterização dos isolados

Para todos os isolados neste trabalho foram anotados a passagem da qual ele foi obtido e o efeito citopático causado pela sua infecção (Tabela 3). A maioria dos novos isolados foram obtidos na 3ª passagem da prospecção. Quanto ao ECP observado, o mais frequente é o arredondamento e a lise celular. Entretanto, para o isolado 36.1 foi observado uma agregação celular em forma de pequenos cachos.

Tabela 3. Novos isolados. Informações sobre cada um dos novos isolados obtidos neste trabalho.

Nome da amostra	Tipo de amostra	Passagem de isolamento	Efeito Citopático identificado	Vírus isolado
Coleção: Pantanal Local: Pantanal - MS Bioma: Pantanal				
P3	Solo	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
Coleção: Serra do Cipó 1 Local: Serra do Cipó - MG Bioma: Cerrado				
17	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
22a	Água doce	2ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
28	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
31	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
40	Água doce	2ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
Coleção: Lagoa da Pampulha Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata atlântica				
22.2	Esgoto	2ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
22.3	Esgoto	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
22.9	Esgoto	2ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
23.2	Lama	1ª	Arredondamento e lise celular	Yaravírus
23.4	Lama	1ª	Arredondamento e lise celular	Yaravírus
23.5	Lama	1ª	Arredondamento e lise celular	Yaravírus
24.5	Esgoto	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
24.7	Esgoto	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
Coleção: Escola de Veterinária da UFMG Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata atlântica				
27.5	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
27.7	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
27.8	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
27.9	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
27.10	Água doce	2ª	Arredondamento e lise celular	Cedratvírus
Coleção: Piauí 1 Local: Teresina - PI Bioma: Cerrado				
36.1	Esgoto	3ª	Arredondamento, agregação celular (tipo cachos) e lise celular	Mimivírus
Coleção: Maranhão Local: São João dos Patos - MA Bioma: Cerrado				
37.1	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
39.3	Água doce	1ª	Arredondamento e lise celular	Mimivírus
39.9	Água doce	2ª	Arredondamento e lise celular	Mimivírus
39.10	Água doce	2ª	Arredondamento e lise celular	Mimivírus
Coleção: Bahia Local: Salvador - BA Bioma: Mata Atlântica				
43.3	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Mimivírus
Coleção: Rio Grande do Sul 1 Local: Porto Alegre - RS Bioma: Pampa				
48.2	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
48.4	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
48.9	Água doce	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
Coleção: Córrego Liberdade Local: Belo Horizonte - MG Bioma: Mata atlântica				
53.2	Esgoto	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
53.6	Esgoto	3ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
53.8	Esgoto	2ª	Arredondamento e lise celular	Marseillevírus
Coleção: Mato Grosso do Sul Local: Bonito - MS Bioma: Cerrado				

55.3	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
55.6	Água doce	2 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
56.3	Água doce	2 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
57.2	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
57.9	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
58.5	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
58.7	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
59.9	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
62.3	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
62.9	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
63.9	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Pandoravirus
64.4	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Mimivirus
Coleção: Piauí 2 Local: Cajueiro da Praia - PI Bioma: Caatinga				
68.4	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
68.5	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
68.7	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.2	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.3	Água salgada	2 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.4	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.5	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.8	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
69.9	Água salgada	3 ^a	Arredondamento e lise celular	Marseillevirus
Coleção: Serra do Cipó 2 Local: Serra do Cipó - MG Bioma: Cerrado				
83.1	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.2	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.4	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.5	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.6	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.9	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
83.10	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
Coleção: Garrafa de plástico Local: não informado Bioma: não informado				
84.3	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
84.4	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
84.5	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
84.6	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
85.3	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
85.4	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
85.6	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like
Coleção: Altamira Local: Altamira - MG Bioma: Cerrado				
Alta 47	Água doce	3 ^a	Arredondamento e lise celular	<i>Pithoviridae</i> -like

Como pode ser observado no gráfico A (Figura 46), foram obtidos novos isolados de todos os tipos de amostras testadas. A maior quantidade foi obtida de amostras de água doce (45 isolados), além de ter sido o tipo de amostra com maior riqueza de grupos virais isolados (pelo menos 4 grupos). Das amostras menos representativas (solo e lama) foram isolados das amostras de solo apenas 1 marseillevirus e das amostras de lama foram obtidos 3 yaravirus. As amostras de água salgada e esgoto tiveram a mesma quantidade de isolados (9 isolados), porém a riqueza de grupos virais foi maior nas amostras de esgoto (3 grupos) do que nas amostras de água salgada (1 grupo).

No gráfico B (Figura 46) podemos observar a quantidade e os grupos virais isolados de cada um dos biomas. A maior quantidade de isolados foi obtida do Cerrado (30 novos isolados) seguido da Mata Atlântica (17 novos isolados). Porém, a quantidade de grupos

virais foi a mesma para ambos (4 grupos), do bioma Cerrado foram obtidos isolados de *Marseillevirus*, *mimivirus*, *pandoravirus* e *pithoviridae*-like, enquanto do bioma da Mata Atlântica foram obtidos isolados de *mimivirus*, *Marseillevirus*, *cedratvirus* e *yaravirus*.

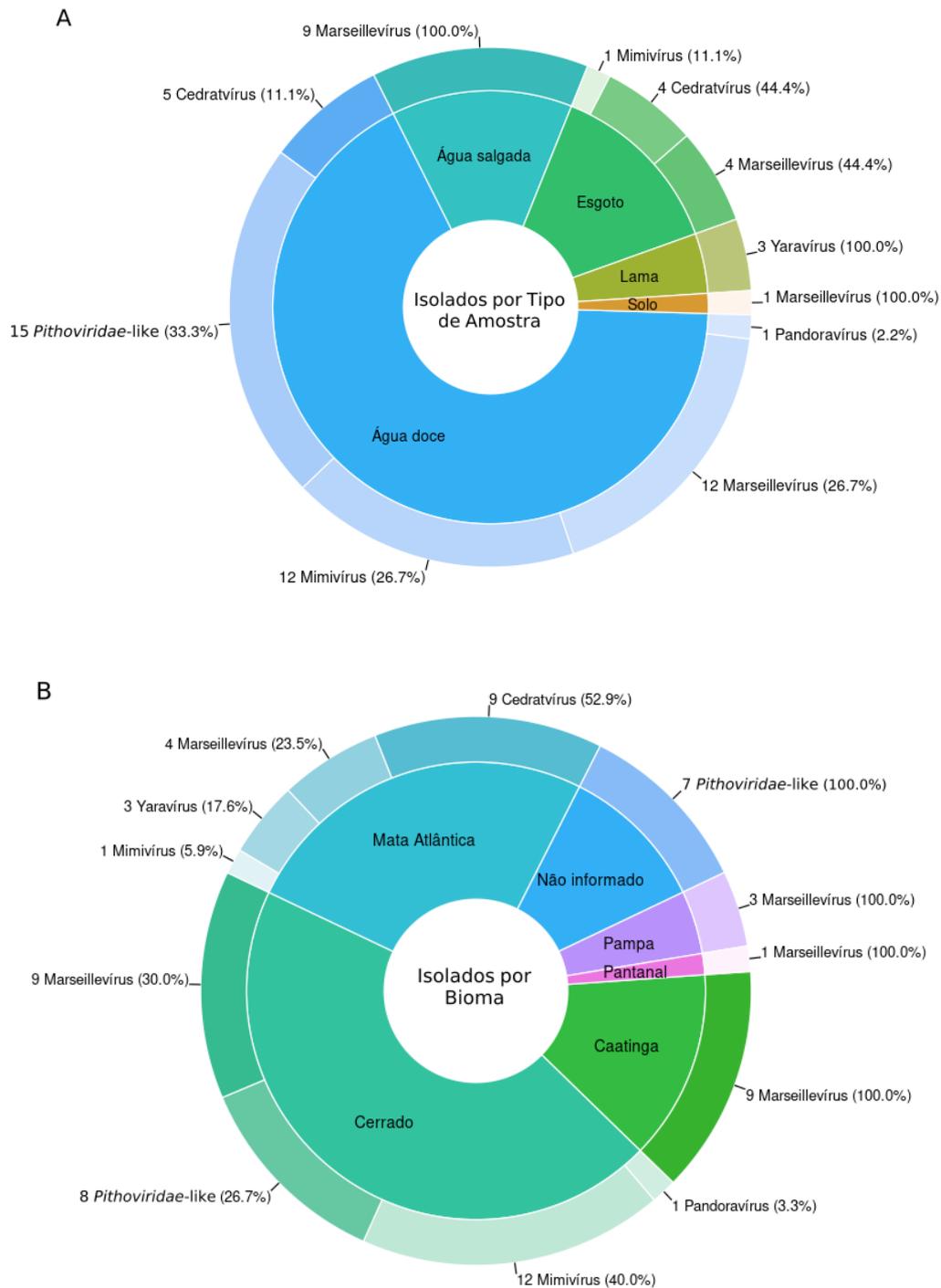


Figura 46. Gráficos com informações sobre os novos isolados. (A) Quantidade e representatividade de cada grupo viral isolado dentro de cada um dos tipos de amostras. A maior variedade de grupos virais foi obtida em água doce. **(B)** Quantidade e representatividade de cada grupo viral isolado dentro de cada um dos biomas. Do Cerrado e da Mata Atlântica foram obtidos 4 grupos virais diferentes, dos demais biomas apenas 1 grupo viral.

7 - DISCUSSÃO

Desde 2011, quando o grupo GEPVIG foi criado, algumas técnicas de isolamento de vírus gigantes foram utilizadas antes da técnica atual de inoculação direta das amostras em uma co-cultura com amebas. Em 2014, Dornas utilizou uma técnica de enriquecimento adaptada de Arslan e colaboradores (2011) que pareceu ter sucesso. Entretanto, essa técnica incluía filtrar as amostras em filtros de 1,2 μm , o que restringia o tamanho dos vírus, resultando em isolamento apenas de vírus que passavam por essa granularidade e impedindo o isolamento de vírus maiores que ficavam retidos nesses filtros. Como descrito por Dornas e colaboradores em 2014, foram processadas 475 amostras e isolados apenas 6 mimivírus (Dornas et al, 2014).

Alguns anos mais tarde, outra técnica foi adotada pelo grupo GEPVIG, que foi adaptada de Gaia e colaboradores (2013). Essa técnica consistia na inoculação das amostras em placas de petri com ágar e o efeito citopático era caracterizado pela observação de placas de lise. Porém, essa técnica não obteve muito sucesso, pois após a observação das placas de lise não era possível recuperar esses vírus (dados não publicados).

Posteriormente, o grupo começou a utilizar a técnica de inoculação direta, que foi sendo aperfeiçoada. Assim, o sucesso do isolamento aumentou, não só em quantidade mas também em diversidade de grupos virais isolados. Um grande trabalho de prospecção foi realizado por Dornas em 2015 utilizando essa técnica. Neste trabalho foram utilizadas diferentes espécies de amebas como plataforma de isolamento (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. griffini* e *V. vermiformis*). Foram processadas 100 amostras de diferentes tipos de ambientes (esgoto, lodo, água, solo úmido e sedimento do lago) e foram obtidos 69 novos isolados. A maioria foi isolada de *A. polyphaga* (46,38%). Porém, a maior diversidade de grupos virais foi isolada de *A. castellanii*, não foi isolado nenhum vírus de *V. vermiformis*. De todos os isolados 85,53% pertenciam à família *Mimiviridae*, destes, 79,73% eram representantes da linhagem A. Além dos mimivírus foram isolados 1 marseillevírus e 1 pandoravírus, ambos de *A. castellanii*. Neste trabalho, a menor taxa de isolamento foi das amostras de esgoto (Dornas et al, 2015). Em 2019, Andrade e colaboradores também fizeram um grande trabalho de prospecção utilizando *A. castellanii*, *A. polyphaga* e *V. vermiformis* como plataformas de isolamento. Foram processadas 976 amostras (clínicas e ambientais) e foram obtidos 68 novos isolados. Neste trabalho, a maior quantidade (75%) e a maior diversidade de vírus foram isolados de *A. castellanii* e, mais uma vez, nenhum vírus foi isolado de *V. vermiformis*. Novamente, a maioria dos isolados também faziam parte da família *Mimiviridae* (60,29%), sendo a maioria da linhagem A (53,6%). Porém, além dos mimivírus foram isolados 1 marseillevírus, dois

pandoravírus e um cedratvírus, todos isolados de *A. castellanii*, comprovando mais uma vez que essa plataforma permite maior isolamento de diferentes grupos virais, enquanto *A. polyphaga* parece ser mais específica para mimivírus. Neste trabalho, a maioria dos isolados foram obtidos a partir de amostras de água (27,42%) (Andrade et al, 2019).

Esses trabalhos demonstram que a técnica de inoculação direta utilizada atualmente alcança um sucesso de isolamento muito maior do que as utilizadas anteriormente e, por isso, foi a técnica utilizada no presente trabalho. Porém, diferente dos trabalhos citados, este utilizou como plataforma de isolamento apenas amebas da espécie *A. castellanii*, pois foi a espécie que se mostrou mais permissiva a diferentes grupos de vírus gigantes. Em contraste aos demais trabalhos que obtiveram uma porcentagem maior de isolamento de membros da família *Mimiviridae*, no presente trabalho foram obtidos mais isolados da família *Marseilleviridae* (38,8%) e da proposta família *Pithoviridae* (35,8%). Além disso, o presente trabalho obteve maior diversidade de grupos virais isolados, incluindo o isolamento de um vírus completamente novo, o Yaravírus.

Além do nosso grupo, outros grupos também realizaram trabalhos de prospecção utilizando a técnica de inoculação direta, inclusive alguns com métodos mais avançados para a co-cultura e identificação de novos isolados (Khalil et al, 2016; Francis et al, 2019). No trabalho de Hadjer Boudjemaa e colaboradores, realizado na Argélia (Boudjemaa et al, 2020), foram processadas 64 amostras de diferentes ambientes (representando 576 poços) em 9 espécies de amebas. Foram obtidos 45 novos isolados de diferentes espécies de hospedeiros. Apesar de terem isolado mimivírus, eles obtiveram maior taxa de isolamento de marseillevírus (55,5%). Assim como no presente trabalho, os mimivírus não foram maioria. Além de mimivírus e marseillevírus, eles isolaram também cedratvírus, faustovírus e um novo vírus que foi denominado fadolivírus (proximamente relacionado aos klosneuvírus). Neste trabalho também foi observada uma maior taxa na quantidade e diversidade de grupos virais isolados em *A. castellanii* (Boudjemaa et al, 2020).

Após a descrição do APMV, intensificou-se a busca por novos vírus gigantes, inclusive através de estudos de metagenômica que visavam encontrar genomas de possíveis novos vírus que ainda não haviam sido descritos. Em 2005, Ghedin e Claverie tiveram sucesso ao analisar um conjunto de dados de sequências obtido a partir de amostras do mar de Sargaço (Atlântico Norte), pois encontraram várias sequências genômicas que, segundo as análises filogenéticas, eram de mimivírus, e trabalhos posteriores também detectaram membros da família *Mimiviridae* em diferentes ambientes aquáticos (Mihara et al, 2018; Shuang Wu et al, 2020). Sequências de vírus gigantes já foram detectadas também em amostras de solos de diversos

ambientes, como desertos, florestas e até mesmo em solos congelados da Antártica (Csaba Kerepesi e Vince Grolmusz, 2015; 2016). Inclusive, já foram descobertos novos vírus gigantes que ainda não haviam sido descritos mas que tiveram seu genoma detectado (Schulz et al, 2017; 2018).

Não há dúvidas de que estudos de metagenômica são importantes para se conhecer a diversidade viral em diferentes ambientes, e podem aumentar o que sabemos sobre a virosfera. Entretanto, apesar de muito importante, a metagenômica não substitui as técnicas de isolamento, pois os estudos de metagenômica identificam apenas sequências de organismos conhecidos presentes naquele ambiente. Por outro lado, o isolamento de novos vírus nos permite ter mais informações sobre seu hospedeiro, como ocorre seu ciclo de multiplicação, como é a relação desse vírus com os demais organismos presentes naquele ambiente e, a partir disso, permite a realização de análises genômicas mais aprofundadas. Além disso, estudos de metagenômica nem sempre conseguem abranger toda a diversidade presente, muitos organismos completamente desconhecidos não estão presentes nos bancos de dados ainda. Um exemplo muito claro disso foi o isolamento do Yaravírus, um vírus completamente novo e que não estava presente em nenhum banco de dados de metagenômica disponível (Boratto, 2020).

A técnica utilizada neste trabalho tem a vantagem de ser realizada em placas de 96 poços, o que permite o processamento de muitas amostras ao mesmo tempo, mesmo sendo feita em duplicata. Com essa técnica tivemos um sucesso considerável de isolamento pois foi possível isolar 67 vírus de 641 alíquotas (taxa de isolamento de 10,45%), além disso, foram obtidos pelo menos 5 grupos virais diferentes: mimivírus, marseillevírus, pandoravírus, cedratvírus, yaravírus, além de 15 isolados da proposta família *Pithoviridae* que precisam ser melhor identificados. Foram obtidos novos isolados de todos os tipos de amostras testadas e de todos os biomas, sendo as amostras de água doce e o bioma cerrado os que obtiveram maior número de isolados.

Um ponto negativo desta técnica é a grande possibilidade de contaminação bacteriana e fúngica devido à origem das amostras. Para tentar contornar este problema, nós aumentamos a quantidade de antibióticos no meio utilizado e procedemos com ciclos de congelamento e descongelamento antes de inocular as amostras nas placas. Entretanto, nem sempre é suficiente, principalmente para amostras de esgotos ou com grande quantidade de matéria em suspensão. Outro problema é a subjetividade na observação do efeito citopático, sendo considerados principalmente o arredondamento e a lise celular. Além disso, essa técnica se limita ao processamento das amostras em protistas pouco móveis que se fixam no substrato,

tornando difícil o processamento utilizando protistas com alta motilidade. Apesar destes problemas, essa técnica foi a melhor escolha considerando a realidade do nosso laboratório e a plataforma de isolamento utilizada (*A. castellanii*) e têm se mostrado satisfatória. A descoberta do Yaravírus comprova que essa técnica pode continuar sendo usada para o isolamento de novos vírus, inclusive de vírus completamente desconhecidos. Nossos achados demonstram como o estudo de prospecção é importante, visto que alguns novos isolados do presente trabalho já contribuíram para a expansão do conhecimento sobre a virosfera (Rodrigues et al, 2018; Andrade et al, 2019, Boratto et al, 2020). Porém, ainda existem muitos vírus desconhecidos na natureza para serem isolados e estudados.

Em relação à identificação dos novos isolados, nós optamos pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura e, assim, observar a morfologia das partículas. Essa técnica foi escolhida para este trabalho, uma vez que através da realização da técnica de PCR em tempo real em trabalhos anteriores (Dornas et al, 2015; Andrade et al, 2019) não foram obtidos resultados muito satisfatórios, provavelmente devido a grande variedade genética existente entre os vírus gigantes de amebas, mesmo dentro da mesma linhagem. Algumas imagens obtidas neste trabalho não ficaram muito nítidas devido a algum problema durante a preparação, e nestes casos, faremos novas preparações para obter novas imagens. Além das imagens obtidas por microscopia eletrônica garantirem uma identificação mais confiável dos grupos virais, uma grande vantagem da utilização de imagens de MET e MEV é a possibilidade de observar estruturas diferentes que geram novos questionamentos e, dessa forma, incentiva a realização de novos estudos, o que não é possível pela identificação através de PCR em tempo real.

8 - CONCLUSÃO

- A utilização da ameba da espécie *Acanthamoeba castellanii* permitiu o isolamento de vários grupos virais distintos.
- A técnica de isolamento utilizada se mostrou satisfatória e cumpriu com o objetivo proposto.
- Foi isolado um vírus completamente novo na virosfera, denominado Yaravírus.
- Foram obtidos 67 novos isolados pertencentes a pelo menos 5 grupos virais diferentes, sendo 13 mimivírus, 26 marseillevírus, 9 cedratvírus, 1 pandoravírus, 3 yaravírus e 15 *pithoviridae*-like.
- Foram obtidos novos isolados de quase todos os seis biomas brasileiros: Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal e em todos os tipos de amostras testadas: água doce, água salgada, esgoto, solo e lama.
- Na maioria dos casos, a identificação morfológica através de imagens de Microscopia Eletrônica funciona muito bem, exceto para diferenciar os cedratvírus dos pithovírus, por possuírem características muito semelhantes. Para estes vírus, o sequenciamento completo do genoma pode ser necessário para desambiguar a identificação;
- O presente trabalho contribuiu para a expansão do conhecimento sobre diversidade e riqueza dos vírus gigantes de amebas no Brasil.

9 - PERSPECTIVAS

- Realizar análises do ciclo de multiplicação de alguns isolados, através de Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Imunofluorescência, utilização de inibidores e, quando possível, contagem de partículas ao longo do ciclo.
- Realizar análises genômicas de alguns isolados. Para isso os vírus terão seus genomas sequenciados e montados. Posteriormente, será feita a identificação de genes e anotação das proteínas.

10 - EVENTOS E PRODUÇÕES

- Foi cursada a carga horária (30 créditos) exigida pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia para o período do mestrado (Anexos)
- Participação como ouvinte e apresentação de pôster no VI Simpósio de Microbiologia da UFMG (2019)
- Participação como ouvinte no I Workshop de Imunologia da UESC (2020)
- Participação como ouvinte no VIII Curso de Férias do PPGBIOCEL da UFMG (2020)
- Participação na comissão organizadora do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2020)
- Participação como ouvinte no XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul (2020)
- Co-autoria no artigo sobre o isolamento e caracterização do Yarávírus:
BORATTO, PAULO V. M. ; OLIVEIRA, GRAZIELE P. ; **MACHADO, TALITA B.** ; ANDRADE, ANA CLÁUDIA S. P. ; BAUDOIN, JEAN-PIERRE ; KLOSE, THOMAS ; SCHULZ, FREDERIK ; AZZA, SAÏD ; DECLOQUEMENT, PHILIPPE ; CHABRIÈRE, ERIC ; COLSON, PHILIPPE ; LEVASSEUR, ANTHONY ; LA SCOLA, BERNARD ; ABRAHÃO, JÔNATAS S. . Yarávirus: A novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA (ONLINE) **JCR** , v. 117, p. 202001637-16586, 2020.
- Participação da equipe que auxilia no diagnóstico molecular de pacientes com suspeita de Covid-19 no Laboratório de Vírus da UFMG (2020/2021)
- Co-autoria no artigo sobre a detecção do genoma de Sars-Cov-2 em amostras ambientais:
ABRAHÃO, JÔNATAS SANTOS; SACCHETTO, LÍVIA ; REZENDE, IZABELA MAURÍCIO ; RODRIGUES, RODRIGO ARAÚJO LIMA ; CRISPIM, ANA PAULA CORREIA ; MOURA, CÉSAR ; MENDONÇA, DIOGO CORREIA ; REIS, ERIK ; SOUZA, FERNANDA ; OLIVEIRA, GABRIELA FERNANDA GARCIA ; DOMINGOS, IAGO ; DE MIRANDA BORATTO, PAULO VICTOR ; SILVA, PEDRO HENRIQUE BASTOS ; QUEIROZ, VICTORIA FULGÊNCIO ; **MACHADO, TALITA BASTOS** ; ANDRADE, LUIS ADAN FLORES ; LOURENÇO, KARINE LIMA ; SILVA, THAÍS ; OLIVEIRA, GRAZIELE PEREIRA ; DE SOUZA ALVES, VIVIANE ; Alves, Pedro Augusto ; Kroon, Erna Geessien ; de Souza Trindade, Giliane ; Drumond, Betânia Paiva . Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: a potential tool for monitoring the circulation of infected patients. SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT **JCR** , v. 1, p. 142645, 2020.

11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C., Almeida, G. M., Boratto, P. V., Colson, P., ... & Kroon, E. G. (2014). Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. *Virology journal*, *11*(1), 1-12.
- Abrahão, J., Silva, L., Silva, L. S., Khalil, J. Y. B., Rodrigues, R., Arantes, T., ... & La Scola, B. (2018a). Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. *Nature communications*, *9*(1), 1-12.
- Abrahão, J., Silva, L., Oliveira, D., & Almeida, G. (2018b). Lack of evidence of mimivirus replication in human PBMCs. *Microbes and infection*, *20*(5), 281-283.
- Aherfi, S., Pagnier, I., Fournous, G., Raoult, D., La Scola, B., & Colson, P. (2013). Complete genome sequence of Cannes 8 virus, a new member of the proposed family "Marseilleviridae". *Virus Genes*, *47*(3), 550-555.
- Aherfi, S., La Scola, B., Pagnier, I., Raoult, D., & Colson, P. (2014). The expanding family Marseilleviridae. *Virology*, *466*, 27-37.
- Aherfi, S., Andreani, J., Baptiste, E., Oumessoum, A., Dornas, F. P., Andrade, A. C. D. S., ... & Colson, P. (2018). A large open pangenome and a small core genome for giant pandoraviruses. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1486.
- Antwerpen, M. H., Georgi, E., Zoeller, L., Woelfel, R., Stoecker, K., & Scheid, P. (2015). Whole-genome sequencing of a pandoravirus isolated from keratitis-inducing acanthamoeba. *Genome announcements*, *3*(2), e00136-15.
- Akashi, M., & Takemura, M. (2019). Co-isolation and characterization of two Pandoraviruses and a Mimivirus from a Riverbank in Japan. *Viruses*, *11*(12), 1123.
- Andrade, K. R., Boratto, P. P., Rodrigues, F. P., Silva, L. C., Dornas, F. P., Pilotto, M. R., ... & Abrahao, J. S. (2015). Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Archives of virology*, *160*(2), 477-482.
- Andrade, A. C. D. S. P., Rodrigues, R. A. L., Oliveira, G. P., Andrade, K. R., Bonjardim, C. A., La Scola, B., ... & Abrahão, J. S. (2017). Filling knowledge gaps for mimivirus entry, uncoating, and morphogenesis. *Journal of virology*, *91*(22), e01335-17.
- Andrade, A. C. D. S. P., Arantes, T. S., Rodrigues, R. A., Machado, T. B., Dornas, F. P., Landell, M. F., ... & Abrahão, J. S. (2018). Ubiquitous giants: a plethora of giant viruses found in Brazil and Antarctica. *Virology journal*, *15*(1), 1-10.
- Andrade, A. C. D. S. P., Victor de Miranda Boratto, P., Rodrigues, R. A. L., Bastos, T. M., Azevedo, B. L., Dornas, F. P., ... & Abrahão, J. S. (2019). New isolates of pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. *Journal of virology*, *93*(5), e01942-18.
- Andreani, J., Aherfi, S., Bou Khalil, J. Y., Di Pinto, F., Bitam, I., Raoult, D., ... & La Scola, B. (2016). Cedratvirus, a double-cork structured giant virus, is a distant relative of pithoviruses. *Viruses*, *8*(11), 300.

- Andreani, J., Khalil, J. Y. B., Sevvana, M., Benamar, S., Di Pinto, F., Bitam, I., ... & La Scola, B. (2017). Pacmanvirus, a new giant icosahedral virus at the crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. *Journal of virology*, *91*(14), e00212-17.
- Andreani, J., Khalil, J. Y., Baptiste, E., Hasni, I., Michelle, C., Raoult, D., ... & La Scola, B. (2018). Orpheovirus IHUMI-LCC2: a new virus among the giant viruses. *Frontiers in microbiology*, *8*, 2643.
- Arantes, T. S., Rodrigues, R. A. L., dos Santos Silva, L. K., Oliveira, G. P., de Souza, H. L., Khalil, J. Y., ... & Abrahão, J. S. (2016). The large Marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. *Journal of virology*, *90*(11), 5246-5255.
- Arslan, D., Legendre, M., Seltzer, V., Abergel, C., & Claverie, J. M. (2011). Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(42), 17486-17491.
- Assis, F. L., Bajrai, L., Abrahao, J. S., Kroon, E. G., Dornas, F. P., Andrade, K. R., ... & Colson, P. (2015). Pan-genome analysis of Brazilian lineage A amoebal mimiviruses. *Viruses*, *7*(7), 3483-3499.
- Bajrai, L. H., Benamar, S., Azhar, E. I., Robert, C., Levasseur, A., Raoult, D., & La Scola, B. (2016). Kaumoebavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses*, *8*(11), 278.
- Brahim Belhaouari, D., Baudoin, J. P., Gnankou, F., Di Pinto, F., Colson, P., Aherfi, S., & La Scola, B. (2019). Evidence of a cellulosic layer in Pandoravirus massiliensis tegument and the mystery of the genetic support of its biosynthesis. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2932.
- Bertelli, C., Mueller, L., Thomas, V., Pillonel, T., Jacquier, N., & Greub, G. (2017). Cedratvirus lausannensis—digging into Pithoviridae diversity. *Environmental microbiology*, *19*(10), 4022-4034.
- Boratto, P. V., Arantes, T. S., Silva, L. C., Assis, F. L., Kroon, E. G., La Scola, B., & Abrahão, J. S. (2015a). Niemeyer virus: a new mimivirus group A isolate harboring a set of duplicated aminoacyl-tRNA synthetase genes. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1256.
- Boratto, P., Albarnaz, J. D., Almeida, G. M. D. F., Botelho, L., Fontes, A. C. L., Costa, A. O., ... & Abrahão, J. S. (2015b). Acanthamoeba polyphaga mimivirus prevents amoebal encystment-mediating serine proteinase expression and circumvents cell encystment. *Journal of virology*, *89*(5), 2962-2965.
- Boratto, P. V. M., Dornas, F. P., da Silva, L. C. F., Rodrigues, R. A. L., Oliveira, G. P., Cortines, J. R., ... & Abrahão, J. S. (2017). The analysis of KV mimivirus major capsid gene and its transcript highlights a distinct pattern of gene evolution and splicing among mimiviruses. *Journal of Virology*.
- Boratto, P. V., Oliveira, G. P., Machado, T. B., Andrade, A. C. S., Baudoin, J. P., Klohe, T., ... & Abrahão, J. S. (2020). Yaravirus: A novel 80-nm virus infecting Acanthamoeba castellanii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(28), 16579-16586.

- Borges, I., Rodrigues, R. A. L., Dornas, F. P., Almeida, G., Aquino, I., Bonjardim, C. A., ... & Abrahão, J. S. (2019). Trapping the enemy: *Vermamoeba vermiformis* circumvents *Faustovirus mariensis* dissemination by enclosing viral progeny inside cysts. *Journal of virology*, *93*(14), e00312-19.
- Boudjemaa, H., Andreani, J., Bitam, I., & La Scola, B. (2020). Diversity of Amoeba-Associated Giant Viruses Isolated in Algeria. *Diversity*, *12*(6), 215.
- Boughalmi, M., Pagnier, I., Aherfi, S., Colson, P., Raoult, D., & La Scola, B. (2013). First isolation of a *Marseillevirus* in the Diptera *Syrphidae* *Eristalis tenax*. *Intervirology*, *56*(6), 386-394.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., ... & Raoult, D. (2009). Giant *Marseillevirus* highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(51), 21848-21853.
- Boyer, M., Madoui, M. A., Gimenez, G., La Scola, B., & Raoult, D. (2010). Phylogenetic and phyletic studies of informational genes in genomes highlight existence of a 4th domain of life including giant viruses. *PLoS One*, *5*(12), e15530.
- Boyer, M., Azza, S., Barrassi, L., Klose, T., Campocasso, A., Pagnier, I., ... & Raoult, D. (2011). Mimivirus shows dramatic genome reduction after intraamoebal culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(25), 10296-10301.
- Brahim Belhaouari, D., Baudoin, J. P., Gnankou, F., Di Pinto, F., Colson, P., Aherfi, S., & La Scola, B. (2019). Evidence of a cellulosic layer in *Pandoravirus massiliensis* tegument and the mystery of the genetic support of its biosynthesis. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2932.
- Campos, R. K., Boratto, P. V., Assis, F. L., Aguiar, E. R., Silva, L. C., Albarnaz, J. D., ... & Abrahão, J. S. (2014). Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virology journal*, *11*(1), 1-11.
- Castelani, A. (1930). An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.* 33:160.
- Castrillón, J. C., & Orozco, L. P. (2013). *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista chilena de infectología*, *30*(2), 147-155.
- Christo-Foroux, E., Alempic, J. M., Lartigue, A., Santini, S., Labadie, K., Legendre, M., ... & Claverie, J. M. (2020). Characterization of *Mollivirus kamchatka*, the first modern representative of the proposed *Molliviridae* family of giant viruses. *Journal of virology*, *94*(8), e01997-19.
- Colson, P., Gimenez, G., Boyer, M., Fournous, G., & Raoult, D. (2011). The giant *Cafeteria roenbergensis* virus that infects a widespread marine phagocytic protist is a new member of the fourth domain of Life. *PLoS One*, *6*(4), e18935.

- Colson, P., De Lamballerie, X., Fournous, G., & Raoult, D. (2012). Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales. *Intervirology*, *55*(5), 321-332.
- Colson, P., De Lamballerie, X., Yutin, N., Asgari, S., Bigot, Y., Bideshi, D. K., ... & Raoult, D. (2013). "Megavirales", a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Archives of virology*, *158*(12), 2517-2521.
- Deeg, C. M., Chow, C. E. T., & Suttle, C. A. (2018). The kinetoplastid-infecting Bodo saltans virus (BsV), a window into the most abundant giant viruses in the sea. *Elife*, *7*, e33014.
- Dornas, F. P., Silva, L. C., De Almeida, G. M., Campos, R. K., Boratto, P. V., Franco-Luiz, A. P., ... & Abrahão, J. S. (2014). Acanthamoeba polyphaga mimivirus stability in environmental and clinical substrates: implications for virus detection and isolation. *PloS one*, *9*(2), e87811.
- Dornas, F. P., Khalil, J. Y., Pagnier, I., Raoult, D., Abrahão, J., & La Scola, B. (2015). Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1086.
- Dornas, F. P., Assis, F. L., Aherfi, S., Arantes, T., Abrahão, J. S., Colson, P., & La Scola, B. (2016). A Brazilian Marseillevirus is the founding member of a lineage in family Marseilleviridae. *Viruses*, *8*(3), 76.
- dos Santos Silva, L. K., Arantes, T. S., Andrade, K. R., Rodrigues, R. A. L., Boratto, P. V. M., de Freitas Almeida, G. M., ... & Abrahão, J. S. (2015). High positivity of mimivirus in inanimate surfaces of a hospital respiratory-isolation facility, Brazil. *Journal of Clinical Virology*, *66*, 62-65.
- Dos Santos, R. N., Campos, F. S., de Albuquerque, N. R. M., Finoketti, F., Côrrea, R. A., Cano-Ortiz, L., ... & Franco, A. C. (2016). A new marseillevirus isolated in Southern Brazil from Limnoperna fortunei. *Scientific reports*, *6*(1), 1-8.
- Doutre, G., Philippe, N., Abergel, C., & Claverie, J. M. (2014). Genome analysis of the first Marseilleviridae representative from Australia indicates that most of its genes contribute to virus fitness. *Journal of virology*, *88*(24), 14340-14349.
- Doutre, G., Arfib, B., Rochette, P., Claverie, J. M., Bonin, P., & Abergel, C. (2015). Complete genome sequence of a new member of the Marseilleviridae recovered from the Brackish submarine spring in the Cassis Port-Miou Calanque, France. *Genome announcements*, *3*(6), e01148-15.
- Filée, J., & Chandler, M. (2010). Gene exchange and the origin of giant viruses. *Intervirology*, *53*(5), 354-361.
- Fischer, M. G., Allen, M. J., Wilson, W. H., & Suttle, C. A. (2010). Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(45), 19508-19513.
- Francis, R., Ominami, Y., Khalil, J. Y. B., & La Scola, B. (2019). High-throughput isolation of giant viruses using high-content screening. *Communications biology*, *2*(1), 1-10.

- Gaia, M., Pagnier, I., Campocasso, A., Fournous, G., Raoult, D., & La Scola, B. (2013). Broad spectrum of mimiviridae virophage allows its isolation using a mimivirus reporter. *PLoS One*, 8(4), e61912.
- Ghedini, E., & Claverie, J. M. (2005). Mimivirus relatives in the Sargasso sea. *Virology Journal*, 2(1), 1-6.
- Ghigo, E., Kartenbeck, J., Lien, P., Pelkmans, L., Capo, C., Mege, J. L., & Raoult, D. (2008). Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS pathogens*, 4(6), e1000087.
- Gorbalenya et al. - International Committee on Taxonomy of Viruses Executive Committee. (2020). The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nature Microbiology*, 5(5), 668.
- Iyer, L. M., Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *Journal of virology*, 75(23), 11720-11734.
- Kerepesi, C., & Grolmusz, V. (2015). The "giant virus finder" discovers an abundance of giant viruses in the Antarctic dry valleys. *arXiv preprint arXiv:1503.05575*.
- Kerepesi, C., & Grolmusz, V. (2016). Giant viruses of the Kutch Desert. *Archives of virology*, 161(3), 721-724.
- Khalil, J. Y., Robert, S., Reteno, D. G., Andreani, J., Raoult, D., & La Scola, B. (2016). High-throughput isolation of giant viruses in liquid medium using automated flow cytometry and fluorescence staining. *Frontiers in microbiology*, 7, 26.
- Khan, N. A. (2006). Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 564-595.
- Khan, M., La Scola, B., Lepidi, H., & Raoult, D. (2007). Pneumonia in mice inoculated experimentally with Acanthamoeba polyphaga mimivirus. *Microbial pathogenesis*, 42(2-3), 56-61.
- Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2015). Is there evidence of sexual reproduction (meiosis) in Acanthamoeba?. *Pathogens and global health*, 109(4), 193-195.
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G., & Dolja, V. V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology direct*, 1(1), 1-27.
- Koonin, E. V., & Yutin, N. (2010). Origin and evolution of eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses. *Intervirology*, 53(5), 284-292.
- Koonin, E. V., Krupovic, M., & Yutin, N. (2015). Evolution of double-stranded DNA viruses of eukaryotes: from bacteriophages to transposons to giant viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1341(1), 10.
- Koonin, E. V., & Yutin, N. (2018). Multiple evolutionary origins of giant viruses.

F1000Research, 7.

Koonin, E. V., & Yutin, N. (2019). Evolution of the large nucleocytoplasmic DNA viruses of eukaryotes and convergent origins of viral gigantism. *Advances in virus research*, 103, 167-202.

Kuznetsov, Y. G., Klose, T., Rossmann, M., & McPherson, A. (2013). Morphogenesis of mimivirus and its viral factories: an atomic force microscopy study of infected cells. *Journal of virology*, 87(20), 11200-11213.

La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., ... & Raoult, D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science*, 299(5615), 2033.

Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., ... & Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), 1185-1193.

Legendre, M., Bartoli, J., Shmakova, L., Jeudy, S., Labadie, K., Adrait, A., ... & Claverie, J. M. (2014). Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4274-4279.

Legendre, M., Lartigue, A., Bertaux, L., Jeudy, S., Bartoli, J., Lescot, M., ... & Claverie, J. M. (2015). In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y-old giant virus infecting Acanthamoeba. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), E5327-E5335.

Legendre, M., Fabre, E., Poirot, O., Jeudy, S., Lartigue, A., Alempic, J. M., ... & Claverie, J. M. (2018). Diversity and evolution of the emerging Pandoraviridae family. *Nature communications*, 9(1), 1-12.

Levasseur, A., Andreani, J., Delerce, J., Bou Khalil, J., Robert, C., La Scola, B., & Raoult, D. (2016). Comparison of a modern and fossil pithovirus reveals its genetic conservation and evolution. *Genome biology and evolution*, 8(8), 2333-2339.

Liu, H., Ha, Y. R., Lee, S. T., Hong, Y. C., Kong, H. H., & Chung, D. I. (2006). Genetic diversity of Acanthamoeba isolates from ocean sediments. *The Korean journal of parasitology*, 44(2), 117.

Lloyd, D. (2014). Encystment in Acanthamoeba castellanii: a review. *Experimental parasitology*, 145, S20-S27.

Lwoff, A. (1957). The Concept of Virus. *Journal of General Microbiology*, 17(23), 239-253.

Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 273-307.

Mihara, T., Koyano, H., Hingamp, P., Grimsley, N., Goto, S., & Ogata, H. (2018). Taxon richness of "Megaviridae" exceeds those of bacteria and archaea in the ocean. *Microbes and environments*, ME17203.

Moreira, D., & López-García, P. (2009). Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 306-311.

Mutsafi, Y., Zauberman, N., Sabanay, I., & Minsky, A. (2010). Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5978-5982.

Philippe, N., Legendre, M., Doutre, G., Couté, Y., Poirot, O., Lescot, M., ... & Abergel, C. (2013). Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science*, 341(6143), 281-286.

Popgeorgiev, N., Boyer, M., Fancello, L., Monteil, S., Robert, C., Rivet, R., ... & Desnues, C. (2013). Marseillevirus-like virus recovered from blood donated by asymptomatic humans. *The Journal of infectious diseases*, 208(7), 1042-1050.

Preston, T. M., & King, C. A. (1984). Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *Microbiology*, 130(9), 2317-2323.

Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., ... & Claverie, J. M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 306(5700), 1344-1350.

Raoult, D., Scola, B. L., & Birtles, R. (2007). The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 95-102.

Raoult, D., & Boyer, M. (2010). Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. *Intervirology*, 53(5), 321-329.

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27(3), 493-497.

Reteno, D. G., Benamar, S., Khalil, J. B., Andreani, J., Armstrong, N., Klose, T., ... & La Scola, B. (2015). Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *Journal of virology*, 89(13), 6585-6594.

Rodrigues, R. A. L., dos Santos Silva, L. K., Dornas, F. P., de Oliveira, D. B., Magalhães, T. F. F., Santos, D. A., ... & Abrahão, J. S. (2015). Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. *Journal of virology*, 89(23), 11812-11819.

Rodrigues, R. A. L., Andreani, J., Andrade, A. C. D. S. P., Machado, T. B., Abdi, S., Levasseur, A., ... & La Scola, B. (2018). Morphologic and genomic analyses of new isolates reveal a second lineage of cedratviruses. *Journal of virology*, 92(13), e00372-18.

Rodrigues, R. A. L., Mougari, S., Colson, P., La Scola, B., & Abrahão, J. S. (2019). "Tupanvirus", a new genus in the family Mimiviridae. *Archives of virology*, 164(1), 325-331.

Rodrigues, R. A., de Souza, F. G., de Azevedo, B. L., da Silva, L. C., & Abrahão, J. S. (2021). The morphogenesis of different giant viruses as additional evidence for a common origin of Nucleocytoviricota. *Current Opinion in Virology*, 49, 102-110.

- Sharma, V., Colson, P., Pontarotti, P., & Raoult, D. (2016). Mimivirus inaugurated in the 21st century the beginning of a reclassification of viruses. *Current opinion in microbiology*, *31*, 16-24.
- Schulz, F., Yutin, N., Ivanova, N. N., Ortega, D. R., Lee, T. K., Vierheilig, J., ... & Woyke, T. (2017). Giant viruses with an expanded complement of translation system components. *Science*, *356*(6333), 82-85.
- Schulz, F., Alteio, L., Goudeau, D., Ryan, E. M., Feiqiao, B. Y., Malmstrom, R. R., ... & Woyke, T. (2018). Hidden diversity of soil giant viruses. *Nature communications*, *9*(1), 1-9.
- Schuster, F. L., & Levandowsky, M. (1996). Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii*: visual analysis of random movement and responses to chemical signals. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *43*(2), 150-158.
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & vectors*, *5*(1), 1-13.
- Silva, L. K. D. S., Andrade, A. C. D. S. P., Dornas, F. P., Rodrigues, R. A. L., Arantes, T., Kroon, E. G., ... & Abrahão, J. S. (2018). Cedratvirus getuliensis replication cycle: an in-depth morphological analysis. *Scientific reports*, *8*(1), 1-11.
- Silva, L. C., Almeida, G. M., Oliveira, D. B., Dornas, F. P., Campos, R. K., La Scola, B., ... & Abrahão, J. S. (2014). A resourceful giant: APMV is able to interfere with the human type I interferon system. *Microbes and infection*, *16*(3), 187-195.
- Suzan-Monti, M., Scola, B. L., Barrassi, L., Espinosa, L., & Raoult, D. (2007). Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PloS one*, *2*(3), e328.
- Takemura, M. (2016). Draft genome sequence of Tokyovirus, a member of the family Marseilleviridae isolated from the Arakawa River of Tokyo, Japan. *Genome announcements*, *4*(3), e00429-16.
- Thomas, V., Bertelli, C., Collyn, F., Casson, N., Telenti, A., Goesmann, A., ... & Greub, G. (2011). Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environmental microbiology*, *13*(6), 1454-1466.
- Volkonsky, M. (1931). Hartmannella castellanii Douglas et classification des Hartmannelles. *Arc. Zoolog. Exp. Gen.*, *72*, 317-319.
- Weisman, R. A., & Korn, E. D. (1967). Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. *Biochemistry*, *6*(2), 485-497.
- Wu, S., Zhou, L., Zhou, Y., Wang, H., Xiao, J., Yan, S., & Wang, Y. (2020). Diverse and unique viruses discovered in the surface water of the East China Sea. *BMC genomics*, *21*(1), 1-15.
- Xiao, C., Kuznetsov, Y. G., Sun, S., Hafenstein, S. L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R.,

- ... & Rossmann, M. G. (2009). Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS biology*, 7(4), e1000092.
- Yoosuf, N., Yutin, N., Colson, P., Shabalina, S. A., Pagnier, I., Robert, C., ... & Koonin, E. V. (2012). Related giant viruses in distant locations and different habitats: *Acanthamoeba polyphaga* mousouvirus represents a third lineage of the Mimiviridae that is close to the megavirus lineage. *Genome biology and evolution*, 4(12), 1324-1330.
- Yoshikawa, G., Blanc-Mathieu, R., Song, C., Kayama, Y., Mochizuki, T., Murata, K., ... & Takemura, M. (2019). Medusavirus, a novel large DNA virus discovered from hot spring water. *Journal of virology*, 93(8), e02130-18.
- Yutin, N., Wolf, Y. I., Raoult, D., & Koonin, E. V. (2009). Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virology journal*, 6(1), 1-13.
- Yutin, N., Colson, P., Raoult, D., & Koonin, E. V. (2013). Mimiviridae: clusters of orthologous genes, reconstruction of gene repertoire evolution and proposed expansion of the giant virus family. *Virology journal*, 10(1), 1-13.
- Yutin, N., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2014). Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology*, 466, 38-52.
- Zauberman, N., Mutsafi, Y., Halevy, D. B., Shimoni, E., Klein, E., Xiao, C., ... & Minsky, A. (2008). Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS biology*, 6(5), e114.

12 - ANEXOS

Preparo do meio PYG

O meio PYG (Peptona, Extrato de Levedura e Glicose) foi o meio adotado pelo grupo por ser o meio utilizado para o cultivo das amebas de vida livre (Tabela 4).

Inicialmente, em um béquer com 300 mL de água milli-Q, foi adicionado 20,0 g de protease peptona (extrato bacto-peptona) (Becton Dickinson, E.U.A) e 2,0 g de extrato de levedura (Becton Dickinson, E.U.A) e misturado em agitador magnético até se solubilizar. Em outro béquer com 300 mL de água milli-Q foi adicionado 0,98 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha); 0,06 g de cloreto de cálcio (CaCl_2) (Merck, Alemanha); 9,0 g de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Quimibrás, Brasil); 0,02 g de sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha); 0,40 g de fosfato dibásico de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha); 0,34 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) (Merck, Alemanha) e 1,0 g de citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Quimibrás, Brasil) que também foram misturados em agitador magnético até a completa solubilização. Posteriormente, as duas soluções foram misturadas e foi adicionada água milli-Q até completar 1 litro de meio. Ao final o pH foi ajustado para 6,5 e o meio foi filtrado, alíquotado em garrafas de vidro de 400 mL e autoclavado. Depois de pronto o meio foi suplementado com 100 UI/mL de Penicilina (Cellofarm, Brasil), 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fungizona (Cultilab, Brasil) e 0,1 mg/mL de Estreptomicina (Sigma-Aldrich, U.S.A). Antes da liberação do meio são realizados dois repiques celulares, caso não haja contaminação o meio é liberado para uso.

Tabela 4. Meio PYG. Componentes do meio PYG e suas respectivas quantidades necessárias para a preparação de 1000 mL.

	Componentes	Quantidade
1	Protease peptona (extrato bacto-peptona)	20,0 g
2	Extrato de levedura	2,0 g
3	Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,98 g
4	Cloreto de cálcio (CaCl_2)	0,06 g
5	Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	9,0 g
6	Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
7	Fosfato dibásico de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,40 g
8	Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)	0,34 g

9	Citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	1,0 g
10	Água milli-Q q.s.p.	1000 mL

Para o meio PYG de prospecção, além dos antibióticos já citados é necessário a adição de 0,004 mg/mL de vancomicina (Inlab, Brasil), 0,004 mg/mL de ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, U.S.A) e 0,020 mg/mL de doxiciclina (Sigma-Aldrich, U.S.A).

As alíquotas de meio devem ser mantidas em câmara fria até o momento do uso.

Preparo do tampão fosfato monossódico 0,1 M

Esta solução é preparada em duas etapas, a partir da mistura de duas soluções distintas:

1. Solução A: fosfato de sódio monobásico

- Adicionar em um béquer 2,76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ e água milli-Q q.s.p 100 mL.
- Misturar em agitador magnético até o soluto dissolver completamente.

2. Solução B: Fosfato de sódio dibásico

- Adicionar em outro béquer 5,37g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e água milli-Q q.s.p 100 mL.
- Misturar em agitador magnético até o soluto dissolver completamente.

3. Solução final:

- Com o auxílio de uma proveta, misturar 19 mL da solução A + 81 mL da solução B. No final terá 100 mL de solução fosfato 0,2 M e pH 7,4.
- Diluir com 100 mL de água milli-Q para ficar com a concentração correta de 0,1 M.

Disciplinas cursadas

Tabela 5. Disciplinas cursadas durante o mestrado.

Disciplina	Período	Créditos
Tóp. Esp. em Microbiologia A	2019/1	02
Bacteriologia	2019/1	06
Tóp. Esp. em Microbiologia A	2019/2	02
Tóp. Esp. em Microbiologia B	2019/2	02
Microbiologia Ambiental	2019/2	03
Micologia Médica	2019/2	03
Treinamento Didático em Microbiologia I	2019/2	02
Seminários em Microbiologia	2020/1	02
Tóp. Esp. em Microbiologia A	2020/1	02
Tóp. Esp. em Microbiologia C	2020/1	03
Micologia Geral	2020/1	03
Tópicos Transversais de Pós-Graduação III	2020/1	03
Total de créditos		33