

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

PROSPECÇÃO DE VÍRUS GIGANTES EM OSTRAS E ÁGUA DO MAR

KÉTYLLEN REIS ANDRADE

**Belo Horizonte
2015**

KÉTYLLEN REIS ANDRADE

PROSPECÇÃO DE VÍRUS GIGANTES EM OSTRAS E ÁGUA DO MAR

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

Orientador: Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão

**Belo Horizonte
2015**

043 Reis Andrade, Kétyllen.
Prospecção de vírus gigantes em ostras e água do mar [manuscrito] /
Kétyllen Reis Andrade. – 2015.

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

Orientador: Jônatas Santos Abrahão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microbiologia. 2. Acanthamoeba polyphaga - Teses. 3. Miniviridae.
4. Molusco. 5. Citoplasma. 6. DNA vírus. I. Abrahão, Jônatas Santos. II.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III.
Título.

CDU: 579

RESUMO

Vírus são organismos ubíquos encontrados em qualquer ambiente em que a vida é presente. São conhecidos como agentes ultramicroscópicos, parasitas intracelulares obrigatórios e dependentes da maquinaria celular hospedeira para sua multiplicação. Entretanto, nas últimas décadas, ganhou projeção científica um grupo monofilético de vírus, extremamente diversificado e complexo, com uma extraordinária variedade estrutural e genômica, levantando questionamentos a respeito da origem e natureza dos vírus. Este grupo é conhecido como Vírus Gigantes Núcleo-Citoplasmáticos de DNA (NCLDV), ou mais recentemente a ordem proposta *Megavirales*. Nos anos 2000, foi caracterizado um vírus extremamente complexo que fez questionar-se tudo o que se conhecia a respeito dos vírus. Este vírus foi denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, o qual foi inserido em uma família viral própria, *Mimiviridae*, por não se encaixar em nenhuma família já existente. Recentemente, vários vírus gigantes têm sido isolados a partir de diferentes ambientes e espécimes, desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de isolados de mimivírus em amostras de ostras e água do mar coletadas em três regiões litorâneas brasileiras. Neste estudo foram utilizadas técnicas de enriquecimento das amostras e isolamento em monocamadas celulares de espécies de *Acanthamoeba castellanii*. Para a caracterização biológica dos novos isolados de mimivírus foram utilizados ensaios de microscopia eletrônica de transmissão, de resistência quando expostos à luz ultravioleta e a temperatura, além do uso de técnicas moleculares a fim de avaliar o perfil molecular de cada isolado. Quatro novos isolados foram caracterizados biológica e molecularmente, nos quais foi possível observar partículas virais semelhantes aos vírus pertencentes à família *Mimiviridae*, bem como possíveis diferenças biológicas e/ou estruturais após a exposição aos ensaios de resistência. Os novos isolados pertencem ao grupo A da família *Mimiviridae*. Além disso, nossos resultados sugerem que as ostras são uma excelente fonte para o isolamento de vírus gigantes.

Palavras-chave: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, *Mimiviridae*, Vírus Gigantes Núcleo-Citoplasmáticos de DNA, ostras.

ABSTRACT

Viruses are ubiquitous organisms found in any environment in which life is present. They are known as ultramicroscopic agents, obligatory intracellular parasites and dependent on the host cellular machinery for their multiplication. However, in recent decades, a monophyletic group of viruses, extremely diverse and complex, with an extraordinary structural and genomic range, came to the scientific forefront, raising questions about the origin and nature of viruses. This group is known as the nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV), and comprise the recently proposed order *Megavirales*. In the 2000s, the characterization of an extremely complex virus put in question everything that was known about viruses. This virus, named *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, was placed into its viral own family, *Mimiviridae*, not fitting to any existing family. Furthermore, several additional giant viruses have been isolated from different environments and specimens. In this context, the aim of this study was to evaluate the incidence of isolated mimivirus in samples of oysters and sea water collected in three brazilian coastal regions. We used techniques of samples enrichment for subsequent isolation in cell monolayers species of *Acanthamoeba castellanii*. For biological characterization of new isolates we used electron microscopy transmission and assays of stress when exposed to ultraviolet light and temperature, and we used molecular techniques to evaluate the molecular profile of each isolate. Four new isolates have been characterized biological and molecularly in which it was possible to observe viral particles similar to viruses belonging to the family *Mimiviridae* and possible biological and / or structural differences after exposure to the stress tests. The new isolates belong to the group A *Mimiviridae* family. Our results also suggest that oysters are an excellent source for the isolation of giant viruses.

Key words: *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, *Mimiviridae*, Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Virus, oyster.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microrganismos intra-amebianos observados através de microscopia óptica após coloração de Gram.	12
Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando a morfologia de simetria icosaédrica típica dos mimivírus..	13
Figura 3: Características únicas para a inserção de um vírus na ordem <i>Megavirales</i>	15
Figura 4: Partícula do APMV visualizada por microscopia eletrônica de transmissão.	17
Figura 5: Reconstrução gráfica das imagens obtidas por crio-micrografia eletrônica da partícula de APMV.....	18
Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura da partícula viral da APMV, evidenciando a abertura do ‘star-gate’.....	18
Figura 7: Distribuição dos 128 genes conservados nos mimivírus.....	20
Figura 8: Representação esquemática do ciclo de multiplicação do APMV em amebas.....	21
Figura 9: Análise de microscopia eletrônica da internalização do APMV em células RAW 264.7.....	23
Figura 10: Tomografia eletrônica do APMV dentro de um fagossomo de uma <i>Acanthamoeba</i> infectada.....	24
Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>A. castellanii</i> infectadas, demonstrando a presença de núcleos esféricos livres (sementes virais) no interior das células..	24
Figura 12: Microscopia eletrônica de partícula virófagos.....	28
Figura 13: Representação esquemática dos quatros domínios propostos com uma origem comum.....	31
Figura 14: Imagem obtida por microscopia óptica de monocamada de <i>A. castellanii</i> inoculada com os espécimes testados.....	46
Figura 15: Testes de resistência.....	50
Figura 16: Comparação entre o perfil proteico total dos isolados BA1, RN30, CO1, SC6 e o protótipo APMV, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	51

Figura 17: Ensaio de curva de ciclo único para os novos isolados comparados ao APMV em amebas <i>A. castellanii</i>	52
Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão de alguns dos novos mimivírus brasileiros isolados, destacando diferentes etapas da morfogênese viral.....	53
Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão dos novos vírus isolados demonstrando a presença de partículas defectivas..	54
Figura 20: Análises filogenéticas baseadas no gene RNA helicase.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características de algumas famílias de vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA.....	11
Tabela 2: Relação das principais amostras de mimivírus e marseillevírus estudados atualmente.....	16
Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real (CAMPOS et al., 2014).	45
Tabela 4: Detecção de mimivírus em amostras de ostras e água do mar, coletadas nos estados brasileiros de Santa Catarina, Bahia e Rio Grande do Norte.	47
Tabela 5: Detecção de mimivírus por qPCR, em amostras de ostras e água do mar, coletadas nos estados brasileiros de Santa Catarina, Bahia e Rio Grande do Norte.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- APMaV:** *Acanthamoeba polyphaga marseillevirus*
- APMV:** *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*
- ATCC:** American Type Culture Collection
- AVL:** Amebas de Vida-Livre
- CrioEM:** Crio-microscopia Eletrônica
- CroV:** *Cafteria roenbergensis virus*
- CTI:** Centro de Terapia Intensiva
- DNA:** Ácido Desoxi-ribonucléico
- EAG:** Encefalite Amebiana Granulomatosa
- EUA:** Estados Unidos da América
- ICTV:** Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses)
- kb:** quilo bases
- MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão
- M.O.I.:** Multiplicidade de Infecção
- MPAAs:** Microrganismos Patogênicos Associados a Amebas
- Mb:** mega bases
- mM:** milimolar
- mL:** mililitros
- mRNA:** RNA mensageiro
- NCLDV:** Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (Nucleo-Cytoplasmatic Large DNA Virus)
- nm:** nanômetros
- nM:** nanomolar
- OLV:** Organic Lake Virus
- ORFs:** Janelas Abertas de Leitura
- PBS:** Tampão Fosfato Salina (Phosphate Buffered Saline)
- PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
- PYG:** Protease Peptona Extrato de Levedura e Glicose
- RNA:** Ácido Ribonucléico
- SMBV:** Samba virus
- TGH:** Transferência gênica Horizontal

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: Ultra-violeta

VAP: Pneumonia Associada à Ventilação

µL: microlitros

µm: micrômetros

µM: micromolar

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV)	10
1.2. Aspectos históricos: descoberta dos mimivírus	11
1.3. Ordem <i>Megavirales</i>	13
1.4. <i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i> (APMV).....	17
1.4.1. Morfologia	17
1.4.2. Genoma.....	19
1.4.3. Ciclo de multiplicação	21
1.4.4. Importância clínica.....	25
1.5. Virófagos.....	27
1.6. Ecologia dos mimivírus	29
1.7. Evolução e o quarto domínio da vida.....	30
1.8. Gênero <i>Acanthamoeba</i>	32
1.9. Biologia das Ostras.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Materiais	37
4.1.1. Meios de cultura	37
4.1.1.1. Meio PYG	37
4.1.1.2. Meio Água-arroz.....	37
4.1.2. Sistemas celulares.....	38
4.1.2.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC 30010).....	38
4.1.3. Vírus	38
4.1.3.1. <i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i> (APMV).....	38
4.2. Métodos	39
4.2.1. Coleção de amostras	39
4.2.2. Preparo das amostras	39
4.2.3. Enriquecimento das amostras.....	39

4.2.4. Isolamento	40
4.2.5. Multiplicação viral (La Scola <i>et al.</i> , 2003)	40
4.2.6. Purificação (La Scola <i>et al.</i> , 2003)	41
4.2.7. Titulação viral (La Scola <i>et al.</i> , 2003)	41
4.2.8. Teste de resistência a UV e temperatura	42
4.2.8. Curva de Ciclo Único	42
4.2.9. Eletroforese em PAGE	43
4.2.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
4.2.10. Extração do DNA viral (Sambrook e Russell, 1989)	44
4.2.11. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	44
4.2.12. Sequenciamento e análises de sequências	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Detecção viral a partir das amostras de ostras	46
5.1.1. Isolamento	46
5.1.2. Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)	47
5.2. Caracterização biológica	48
5.2.1. Teste de resistência a temperatura e a luz ultra-violeta (UV)	48
5.2.2. Perfil proteico	51
5.2.3. Curva de ciclo único	51
5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão	52
5.3. Caracterização molecular	54
5.3.1. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene RNA helicase	
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus Gigantes Núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV)

Vírus são organismos ubíquos encontrados em qualquer ambiente com presença de vida. São tradicionalmente conhecidos por seu tamanho ultramicroscópico, sendo parasitas intracelulares obrigatórios, dependentes da maquinaria celular do hospedeiro para sua multiplicação, e apresentam genomas de tamanho pequeno que permitem a codificação de poucas proteínas. Entretanto, um grupo de vírus monofilético, extremamente complexo em estrutura e composição do genoma, ganhou importância nos últimos anos, levantando questões a respeito da origem e natureza dos vírus. Este grupo de vírus, denominado Vírus Gigantes Núcleo-Citoplasmático de DNA (NCLDV), é caracterizado por um genoma de DNA dupla fita, com um tamanho entre 100 kb e 2,5 Mb, sendo os vírus capazes de codificar centenas de proteínas, das quais muitas são atípicas ou novas para um vírus (Tabela 1). Os vírus pertencentes a este grupo infectam uma ampla gama de hospedeiros eucarióticos incluindo algas (*Phycodnaviridae*), protistas (*Mimiviridae*) e metazoários (*Poxviridae*, *Asfaviridae*, *Iridoviridae*). As famílias virais pertencentes a este grupo compartilham um conjunto de genes conservados os quais atuam na replicação, transcrição e morfogênese da partícula, o que sugere uma origem a partir de um único ancestral viral (IYER *et al.*, 2006; FILÉE, 2009; YUTIN e KOONIN, 2009; ETEN, LANE e DUNIGAN, 2010; ETEN, 2011).

Os NCLDVs apresentam uma independência relativa do sistema de replicação/transcrição das células hospedeiras, pois são capazes de codificar várias DNA polimerases (família B), topoisomerase tipo Ia, DNA primase, DNA ligase, dUTPase, timidinaquinase, helicases e chaperonas. Além de genes que atuam na replicação e no metabolismo do DNA, há genes envolvidos na transcrição (subunidades de RNA polimerase, por exemplo) (RAOULT, 2005; IYER *et al.*, 2006; FILÉE, 2009).

A hipótese mais aceita acerca da origem do grupo NCLDV é de que eles sejam um grupo monofilético, mas há controvérsias no que se refere ao tamanho e à morfologia deste vírus ancestral e como diferentes famílias virais

se originaram a partir dele. Há três hipóteses que tentam explicar a evolução desse grupo de vírus. A primeira diz que os NCLDV's evoluíram e se diversificaram ao perder alguns genes comuns e adquirir novos genes a partir de seus hospedeiros. A segunda hipótese diz que a evolução tenha se dado a partir de um vírus ancestral ainda maior e com um genoma mais extenso, que foi se adaptando e diferenciando através do processo de redução genômica. Por fim, a terceira hipótese sugere que os NCLDV's surgiram a partir de um ancestral com genoma pequeno, que foi se adaptando e adquirindo genes de seus hospedeiros através do processo de transferência gênica horizontal (TGH) (CLAVERIE *et al.*, 2006; MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; ETTEEN, LANE e DUNIGAN, 2010; ETTEEN, 2011).

Tabela 1: Principais características de algumas famílias de vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA.

Família	Hospedeiro	Tamanho do genoma	Sítio de multiplicação
<i>Phycodnaviridade</i>	Algas	150 – 400	Núcleo e Citoplasma
<i>Poxviridade</i>	Insetos, répteis, aves e mamíferos	130 – 380	Citoplasma
<i>Asfaviridade</i>	Mamíferos	170	Citoplasma
<i>Ascoviridade</i>	Insetos	150 – 190	Núcleo e Citoplasma
<i>Iridoviridae</i>	Insetos, animais de sangue frio	100 – 200	Citoplasma
<i>Mimiviridae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	730 – 1300	Citoplasma
<i>Marseilleviridae</i>	<i>Acanthamoeba</i>	346 – 374	Citoplasma
<i>Pandoravirus*</i>	<i>Acanthamoeba</i>	1900 – 2500	Núcleo e Citoplasma
<i>Phitovirus*</i>	<i>Acanthamoeba</i>	600	Citoplasma

Fonte: Yutin *et al.*, 2009; Colson *et al.*, 2013a; Philippe *et al.*, 2013; Legendre *et al.*, 2014 - modificado. *Estes vírus ainda não foram agrupados em nenhuma família viral.

1.2. Aspectos históricos: descoberta dos mimivírus

A descoberta do primeiro mimivírus aconteceu após tentativas frustradas de caracterização de microrganismos patogênicos associados a amebas (MPAAs), que estavam causando em surto de pneumonia nosocomial em um hospital público na cidade de Bradford, Inglaterra, em 1992. A partir de amostras de água coletadas de torres de resfriamento de água, pesquisadores isolaram um microrganismo semelhante a um coco gram-positivo (Fig. 1).

Diversas tentativas de caracterização, como isolamento em placas de ágar e identificação molecular utilizando iniciadores bacterianos universais para a região 16S do DNA ribossomal falharam (RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; LA SCOLA *et al.*, 2003; SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; SUZAN-MONTI *et al.*, 2006; CLAVERIE *et al.*, 2009).

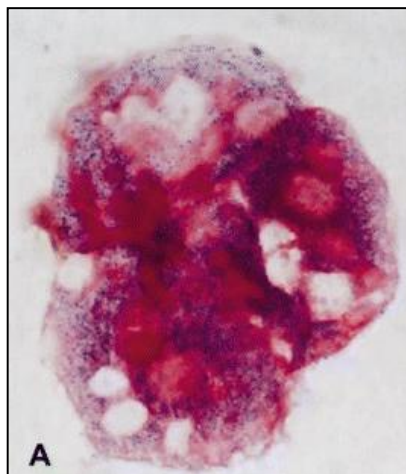


Figura 1: Microrganismos intra-amebianos observados através de microscopia óptica após coloração de Gram. Aparentes cocos gram-positivos no interior de uma ameba, este microrganismo foi nomeado de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*.

Fonte: Raoult, La Scola e Birtles, 2007 – modificado.

Em 2003, pesquisadores de um grupo francês coordenado pelo professor Didier Raoult (Universidade de Marseille, França), com o auxílio da técnica de microscopia eletrônica revelaram a ultra-estrutura dos cocos de Bradford. Para a surpresa do grupo, foram observadas estruturas ‘não-bacterianas’ dentro de amebas infectadas. Estes elementos consistiam em formas de simetria aparentemente icosaédrica muito regulares, semelhantes ao capsídeo dos iridovírus (Fig. 2) (RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; LA SCOLA *et al.*, 2003).

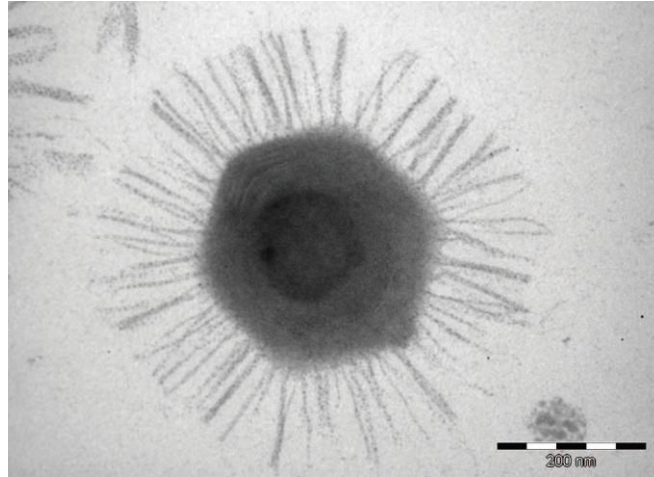


Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando a morfologia de simetria icosaédrica típica dos mimivírus. Estrutura da partícula do *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* apresentando uma simetria icosaédrica circundado por longas fibras superficiais.

Fonte: Raoult, 2005.

Trabalhos adicionais foram necessários para sustentar as suposições de que o microrganismo identificado era realmente um vírus. Testes demonstraram que o microrganismo continha um genoma de DNA dupla-fita e sofria uma fase eclipse de multiplicação típica de vírus. Além disso, foi observado que a montagem das partículas ocorria em um local intracelular específico que foi denominado ‘fábrica viral’, o mesmo havia sido observado em outros vírus, incluindo os iridovírus. Foi proposto ao novo vírus a denominação *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) ou somente mimivírus, por seu hospedeiro ser uma ameba da espécie *Acanthamoeba polyphaga* e por possuir a habilidade de *mimetizar micróbios* (RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; LA SCOLA *et al.*, 2003; SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; SUZAN-MONTI *et al.*, 2006; VINCENT, LA SCOLA e PAPAIZIAN, 2010).

1.3. Ordem Megavirales

Com a descoberta do APMV uma nova família viral foi criada, *Mimiviridae*, pois as características especiais deste novo vírus não permitiram que ele fosse inserido em nenhuma família existente (DESNUES e RAOULT, 2010). Nesta família são englobados os vírus gigantes de DNA que infectam amebas e provavelmente outros eucariotos unicelulares (YUTIN *et al.*, 2009; COLSON *et al.*, 2013b).

A família *Mimiviridae* é composta por dois gêneros: o gênero *Mimivirus* (grupo I), no qual estão inseridos os vírus semelhantes ao APMV (vírus protótipo do gênero); e o gênero *Cafeteriavirus* (grupo II), que é composto por uma única espécie, *Cafeteria roenbergensis virus* (CroV) (COLSON *et al.*, 2011a; ICTV, 2014). Os vírus pertencentes ao grupo I são vírus que infectam amebas, principalmente do gênero *Acanthamoeba*, e após análises filogenéticas baseadas no gene da DNA polimerase B foram divididos em três linhagens (A, B e C) (COLSON *et al.*, 2013a).

Após a descoberta do APMV, diversos vírus gigantes têm sido isolados de diferentes ambientes, como: o *Mamavirus* que foi inicialmente isolado em *A. polyphaga* após as amebas serem inoculadas com amostras coletadas de torres de resfriamento de água em Paris (França), e os estudos seguintes foram realizados em *A. castellanii*, então o vírus foi denominado *Acanthamoeba castellanii mamavirus* (COLSON *et al.*, 2011b); o *Acanthamoeba polyphaga moutouvirus*, isolado a partir de amostras de água coletadas em torres de resfriamento industrial (YOOSUF *et al.*, 2012); o *Megavirus chilensis* que foi isolado de amostras de águas do mar da costa chilena (ARSLAN *et al.*, 2011). Os mimivírus e os mamavírus estão incluídos na linhagem A, enquanto os moutovírus são classificados na linhagem B e o *Megavirus chilensis* na linhagem C (ARSLAN *et al.*, 2011; COLSON *et al.*, 2011b; COLSON *et al.*, 2013a; CLAVERIE, 2013; GAIA *et al.*, 2014).

Em 2007, um novo vírus foi isolado a partir de águas de torres de resfriamento em Paris, França. Este vírus foi denominado *Acanthamoeba polyphaga marseillevirus* (APMaV) (Tabela 2). Posteriormente foi proposta uma nova família, *Marseilleviridae*, pois estes novos vírus apresentam características distintas dos NCDLV já descritos (BOYER *et al.*, 2009). Em 2013, esta nova família foi aceita pelo ICTV e é atualmente constituída por dois gêneros, sendo *Marseillevirus* com duas espécies, *Marseillevirus marseillevirus* (espécie protótipo) (BOYER *et al.*, 2009) e *Senegalvirus marseillevirus* (COLSON *et al.*, 2013b); e um gênero ainda não classificado que é composto por duas espécies, *Lausannevirus* e *Tunisvirus* (THOMAS *et al.*, 2011; AHERFI *et al.*, 2014; ICTV, 2014).

Em 2014 foi descrito o primeiro vírus gigante brasileiro, denominado *Samba virus* (SMBV), que foi isolado a partir de amostras de água do Rio

Negro, no estado do Amazonas. Através de análises filogenéticas o SMBV foi agrupado na linhagem A da família *Mimiviridae* (CAMPOS *et al.*, 2014).

Baseado em características únicas (Fig. 3), Colson e colaboradores (2012) propuseram a criação de uma nova ordem, *Megavirales*, na qual as famílias *Mimiviridae* e *Marseilleviridae* estariam inseridas (Tabela 2).

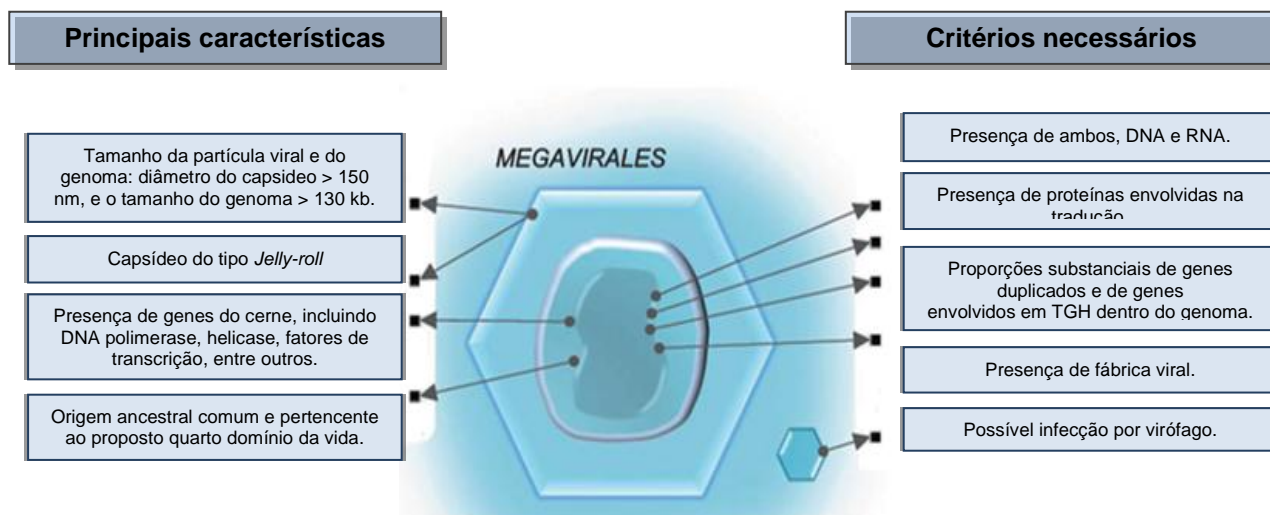


Figura 3: Características únicas para a inserção de um vírus na ordem *Megavirales*. Principais características e critérios necessários para que os vírus gigantes sejam aceitos como membros da ordem *Megavirales*.

Fonte: Colson *et al.*, 2012 – modificado.

Outros vírus gigantes, recentemente isolados, aguardam classificação e aceitação pelo ICTV. Como por exemplo, o *Pandoravirus salinus* (isolado de água do mar da costa do Chile); o *Pandoravirus dulcis* (isolado de uma lagoa de água doce em Melbourne, Austrália) (PHILIPPE *et al.*, 2013); o *Pithovirus* (isolado de um 'permafrost' siberiano datado de 30.000 anos) (LEGENDRE *et al.*, 2014). É esperado que nos próximos anos o ICTV incorpore também outros gêneros às famílias *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*, e que acate a sugestão da criação da ordem *Megavirales*.

Tabela 2: Relação das principais amostras de mimivírus e marseillevírus estudados atualmente.

Família	Vírus	Origem	Tamanho do genoma (Mb)	Tamanho da partícula (variável) (nm)	Referências	
Mimiviridae	Mimivirus	Torres de resfriamento de água	1.2	400	La Scola <i>et al.</i> , 2013	
	Mamavirus		1.2	450	Colson <i>et al.</i> , 2011b	
	Moumouvirus		1.02	420	Yoosuf <i>et al.</i> , 2012	
	Monvevirus		NA	390	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Busvirus		NA	400	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Longchamps virus	Fontes decorativas	NA	450	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Montpellier virus		NA	370	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Saintcharles virus		NA	230	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Courdo11 virus	Água de rios e lagos	1.25	450	Yoosuf <i>et al.</i> , 2014b	
	Courdo5 virus		NA	400	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Courdo7 virus		NA	400	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Cher Cher virus		NA	420	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Lactours virus		NA	450	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Samba virus		1.21	574	Campos <i>et al.</i> , 2014	
	Terra1 virus		Solo	1.3	420	Yoosuf <i>et al.</i> , 2014 ^a
	Terra2 virus			1.3	370	Yoosuf <i>et al.</i> , 2014a
	Pointerouge1 virus	Água do mar	NA	390	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Pointerouge2 virus		NA	500	La Scola <i>et al.</i> , 2010	
	Megavirus chiliensis		1.2	680	Arslan <i>et al.</i> , 2011	
	Cafeteria roenbegensis virus		0.730	300	Yutin <i>et al.</i> , 2013	
Fauteuil virus	Água de hospital	NA	600	La Scola <i>et al.</i> , 2010		
Lentillevirus	Lentes de contato	NA	500	Desnues <i>et al.</i> , 2012		
Marseilleviridae	Cannes8 virus	Torres de resfriamento	0.374	190	Aherfi <i>et al.</i> , 2013	
	Marseillevirus		0.368	250	Colson <i>et al.</i> , 2013a	
	Lausannevirus	Água de rio	0.346	190 - 220	Thomas <i>et al.</i> , 2011	
	Senegal virus	Fezes humanas	0.372	210	Colson <i>et al.</i> , 2013a	

1.4. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV)

1.4.1. Morfologia

O APMV apresenta uma partícula com cerca de 700nm de diâmetro, não sendo, portanto filtrado em membranas com poros de 220 nm, o que acontece com a maioria dos vírus. Como mencionado, sua morfologia externa inicialmente levou a sua falsa identificação como bactéria. Estudos de microscopia crio-eletrônica (crioEM) mostraram que os mimivírus possuem um diâmetro de cerca de 500 nm com múltiplas camadas de membranas proteicas que envolvem o cerne. Além disso, há uma densa camada de longas fibrilas de até 300nm de comprimento, que recobrem a superfície viral podendo aumentar consideravelmente o tamanho da partícula. Porém, as funções das fibras ainda não são totalmente conhecidas, mas acredita-se que atuem na adsorção viral e na proteção contra radiação solar (Fig. 4A-B) (LA SCOLA *et al.*, 2003, MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; XIAO *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2014).

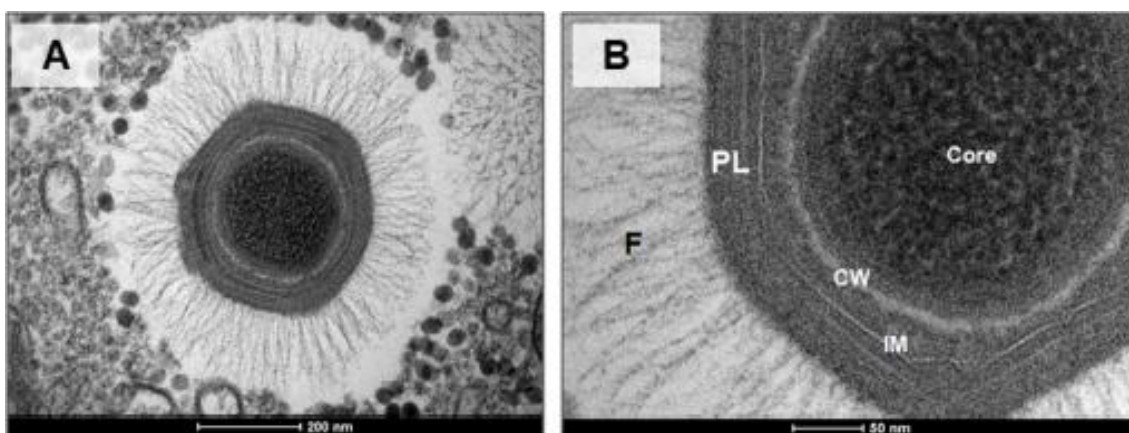


Figura 4: Partícula do APMV visualizada por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Microscopia eletrônica de transmissão do APMV mostrando a partícula completa. (B) Aumento da imagem destacando uma camada densa de fibrilas (F), múltiplas camadas proteicas ao redor do capsídeo (PL), uma membrana interna (IM), e uma parede do cerne (CW) que protege o genoma viral e fatores precoces.

Fonte: Abrahão *et al.*, 2014 – modificado.

Após a realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de amebas infectadas, foi possível observar uma estrutura em forma de ‘estrela do mar’ ou ‘star-gate’, associada a uma face pentagonal do capsídeo, esta

estrutura permite que o genoma viral seja liberado no citoplasma da célula hospedeira durante o ciclo de multiplicação (Fig. 5 e 6). Estes estudos revelaram também que os mimivírus apresentam uma simetria pentagonal, e não classicamente icosaédrica como se acreditava (XIAO *et al.*, 2009).

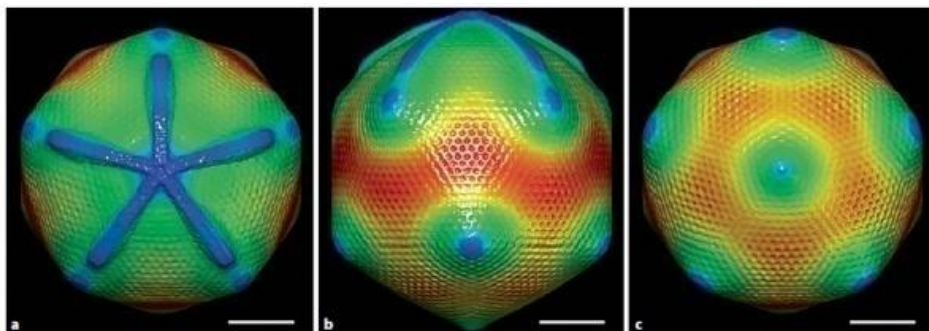


Figura 5: Reconstrução gráfica das imagens obtidas por crio-micrografia eletrônica da partícula de APMV. Estrutura externa da partícula em diversos ângulos, evidenciando a estrutura 'star-gate' associada a um vértice, (A) estrutura 'star-gate' associada a um vértice; (B) um dos vértices da partícula; (C) vértice oposto ao 'star-gate'.

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

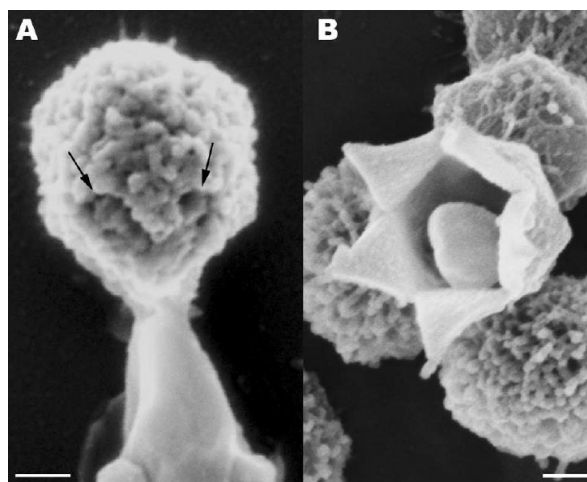


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura da partícula viral da APMV, evidenciando a abertura do 'star-gate'. (A-B) APMV apresentando via de liberação de DNA diferenciada.

Fonte: Zauberman *et al.*, 2008.

Por apresentarem características estruturais diversificadas, alguns autores sugerem que os mimivírus sejam verdadeiras “quimeras biológicas”. O genoma viral envolto por uma matriz fibrosa e membranas lipídicas semelhantes a células eucarióticas; a existência de um único vértice,

possivelmente associado à liberação do genoma, que se assemelha à cauda de bacteriófagos; e uma matriz externa de peptidoglicano semelhante à parede celular bacteriana. Por essas e outras razões, vários pesquisadores acreditam que os mimivírus, e outros NCLDV, poderiam ter adquiridos essas características através do fenômeno da TGH, em que vírus gigantes trocariam informações gênicas com seu hospedeiro e os organismos que os circundam, principalmente no ambiente interno de amebas (XIAO *et al.*, 2009).

1.4.2. Genoma

Os mimivírus apresentam um genoma de DNA dupla fita com aproximadamente 1,2 Mb, capaz de codificar mais de 1000 genes. Possui somente uma pequena proporção de DNA não-codificante (9,5%) e aproximadamente 1.260 janelas abertas de leitura (ORF), das quais cerca de 10% apresenta similaridade com outras proteínas de funções conhecidas. Muitos dos genes encontrados nos mimivírus não foram anteriormente observados em outros vírus. Dentre as proteínas codificadas, deve-se destacar as que estão envolvidas no processo de tradução, reparo do DNA, motilidade celular e biogênese de membranas. Alguns dos genes codificados são encontrados somente em células eucarióticas, o que aumenta o interesse da comunidade científica, pois o genoma, o metabolismo e a estrutura intrínseca sugerem que os mimivírus teriam se originado a partir de um 'bridge' evolucionário entre os vírus e as células eucarióticas (SHURE, 2005b; SUZAN-MONTI, LA SCOLA e RAOULT, 2006; CLAVERIE *et al.*, 2006; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; LEGENDRE *et al.*, 2010).

O genoma dos mimivírus apresenta uma região central altamente conservada, que codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo de ácido nucléico. Uma característica intrigante revelada por análises do conteúdo gênico dos mimivírus foi a presença de genes codificadores de proteínas envolvidas no processo de tradução, como as aminoacil-tRNA sintetase e fatores de alongação, sugerindo que estes vírus podem não depender completamente da maquinaria de tradução do hospedeiro para a sua replicação (RAOULT *et al.*, 2004; COLSON *et al.*, 2013c).

O genoma dos mimivírus é também particularmente rico em adenina e timina (AT – aproximadamente 75% do conteúdo de nucleotídeo). Além disso, foi relatado em alguns estudos que os mimivírus e outros vírus gigantes apresentam diferentes composições de aminoácidos em seu proteoma quando comparados com os organismos celulares (MRAZEK e KARLIN, 2007; COLSON *et al.*, 2013c).

O estudo da evolução viral usando análises filogenéticas é na maioria das vezes uma tarefa difícil devido a várias peculiaridades relacionadas ao estilo de vida parasitário, bem como rápidas taxas evolucionárias e a propensão de serem envolvidos em eventos de TGH. Estes eventos de TGH parecem ser importantes para a formação e riqueza dos genomas dos mimivírus, bem como para a adaptação destes vírus ao hospedeiro. Estudos filogenéticos sugerem que os mimivírus certamente adquiriram a maioria de seus genes ou de seus hospedeiros eucariotos ou de outros parasitas coexistentes no mesmo hospedeiro (Fig. 7), em um modelo evolutivo conhecido como simpatria (SUHRE, AUDIC e CLAVERIE, 2005; MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008).

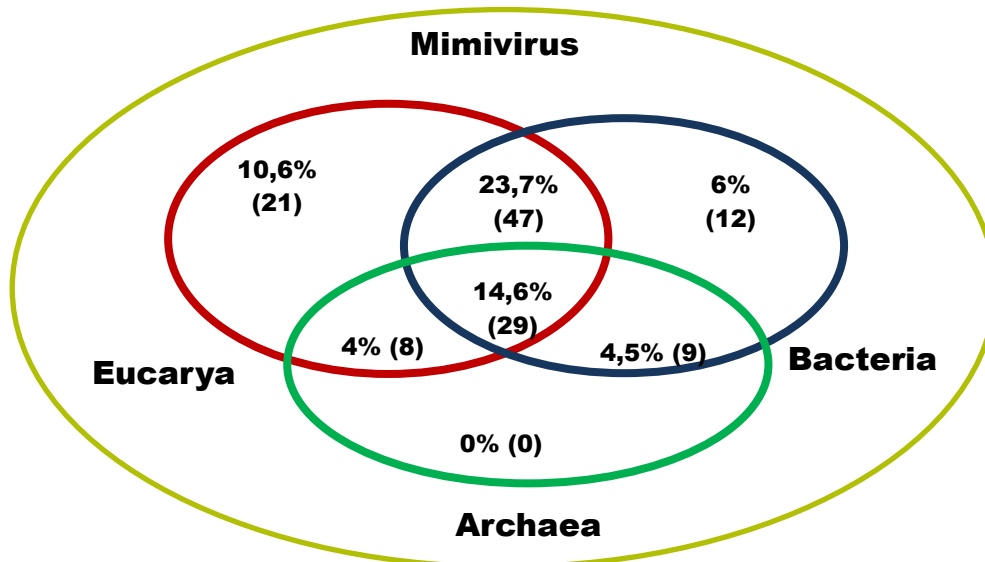


Figura 7: Distribuição dos 128 genes conservados nos mimivírus. Pode-se observar a associação entre os domínios da vida, e o número de genes homólogos entre eles.

Fonte: Moreira e Brochier-Armanet, 2008 – modificado.

1.4.3. Ciclo de multiplicação

Semelhante aos poxvírus, o ciclo de multiplicação dos mimivírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Fig. 8), associado a fábricas virais bem delimitadas, e apresenta uma expressão gênica temporal. Através da combinação de diferentes técnicas de imagem, pesquisadores observaram que, ao contrário da maioria dos vírus de DNA, o genoma do mimivírus não é direcionado para o núcleo, sendo que o início da transcrição dos genes precoces virais se dá em parte por complexos de transcrição que são carregados pelas partículas do APMV. No entanto, este processo não deve ser considerado independente do núcleo, pois fatores nucleares podem ser requeridos para participarem do processo de replicação (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; CLAVERIE *et al.*, 2009b; MUTSAFI *et al.*, 2010; KUZNETSOV *et al.*, 2013; ABRAHÃO *et al.*, 2014).

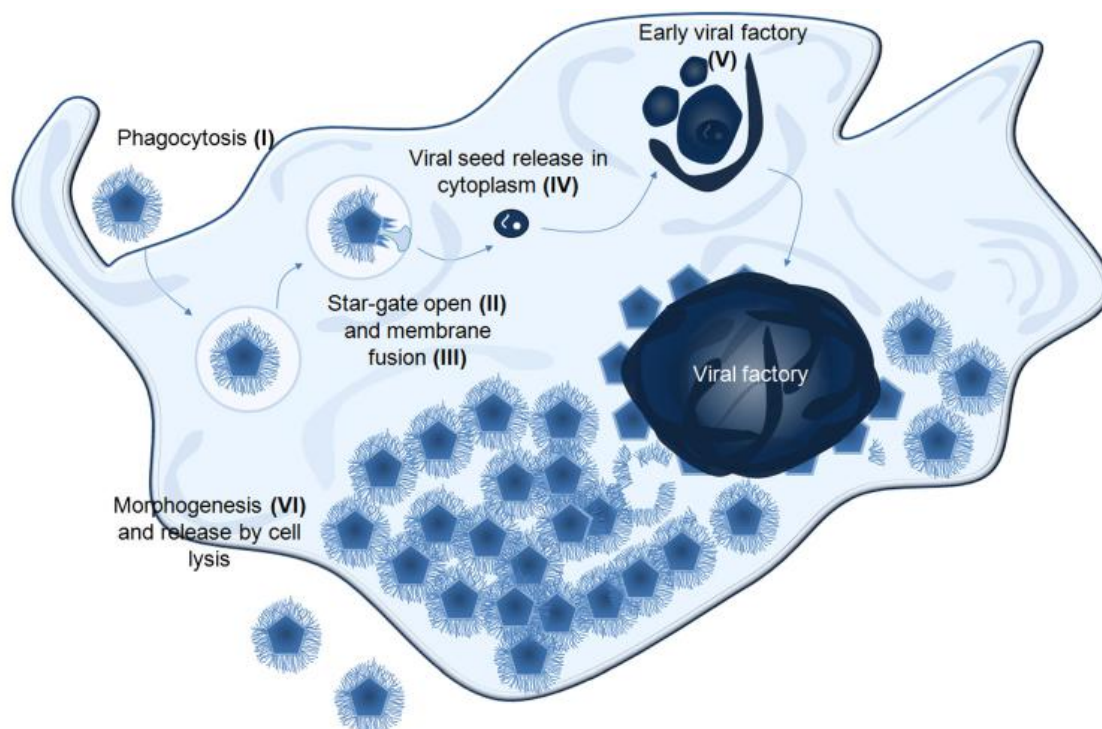


Figura 8: Representação esquemática do ciclo de multiplicação do APMV em amebas. (I) Fagocitose. (II - III) Forma um fagossomo que envolve a partícula, em seguida o 'star-gate' se abre e ocorre a fusão da membrana viral com o fagossomo. (VI) A semente viral é liberada no citoplasma da ameba e inicia a formação da fábrica viral. Após horas, a fábrica viral cresce e inicia a morfogênese (VI) da progênie viral. Os vírus maduros são liberados, posteriormente, por lise celular.

Fonte: Abrahão *et al.*, 2014.

O ciclo de multiplicação dos mimivírus tem início com a penetração da partícula viral na célula hospedeira, amebas ou células fagocitárias profissionais (humanas e murinas) (GHIGO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013), através do processo de fagocitose (Fig. 9 A-F). Em seguida, as partículas são envolvidas por um fagossomo (Fig. 9 G-I), após o genoma é liberado no citoplasma através da abertura do 'star-gate' e fusão da membrana viral com o fagossomo (Fig. 10) (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; MUTSAFI *et al.*, 2010; KUZNETSOV *et al.*, 2013).

Após o desnudamento, o genoma se estabiliza e é observada a presença de núcleos esféricos livres (sementes virais) (Fig. 11), das quais ao redor se formam as fábricas virais, local onde a replicação do genoma viral e a morfogênese ocorrem. A origem das fábricas virais, em geral uma por célula, e o seu desenvolvimento, é ainda obscuro. Mas estudos têm sugerido que as fábricas virais podem envolver elementos do retículo endoplasmático e membrana nuclear, os quais em amebas estão localizados próximos às margens do núcleo. Pouco se sabe sobre a morfogênese do capsídeo dentro das fábricas virais e sobre a formação da face única onde se encontra o 'star-gate', mas em um estudo recente, pesquisadores observaram que proteínas se acumulam na membrana externa das fábricas virais e seriam responsáveis pela origem e montagem do 'star-gate' (MUTSAFI *et al.*, 2013; KUZNETSOV *et al.*, 2013).

Em um recente estudo foi observada a formação de vesículas transportadoras cerca de 2 horas pós-infecção, e este evento ocorre antes do aparecimento visível das fábricas virais. A origem precisa das vesículas de transporte não é totalmente clara. Sua presença não foi observada em células não infectadas, presumivelmente, elas são o resultado de nova síntese pós-infecção. A geração das vesículas de transporte ocorre próximo ao núcleo, portanto, assim há uma possibilidade de serem derivadas das membranas nucleares ou do retículo endoplasmático rugoso (KUZNETSOV *et al.*, 2013).

As vesículas de transporte são as precursoras das fábricas virais, as quais além de serem local da replicação do genoma, estão também envolvidas na produção de enormes quantidades de proteínas, portanto essas estruturas são apontadas como carreadoras de fatores necessários à replicação viral dentro das fábricas virais (KUZNETSOV *et al.*, 2013).

Oposto aos sítios onde ocorre a replicação do genoma, há um acúmulo de novos RNAs mensageiros (mRNA) que são os produtos da fase inicial da transcrição do genoma viral. A fase tardia do ciclo é caracterizada pela morfogênese das partículas, o empacotamento do genoma viral e aquisição de uma camada proteica a qual posteriormente servirá para o ancoramento das fibras superficiais (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; MUTSAFI *et al.*, 2010; KUZNETSOV *et al.*, 2013).

Antes da liberação dos vírus, as fibras são ancoradas à partícula (KUZNETSOV *et al.*, 2013). O ciclo de multiplicação se finaliza com a liberação das partículas virais através da lise da célula hospedeira.

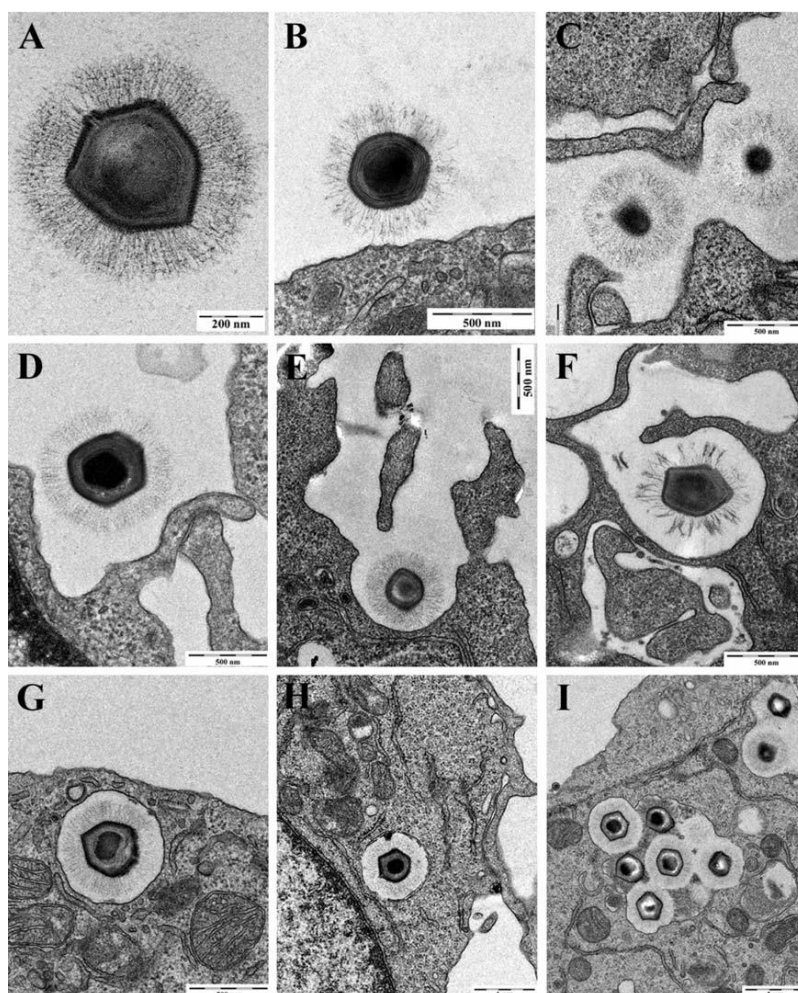


Figura 9: Análise de microscopia eletrônica da internalização do APMV em células RAW 264.7. A) APMV no ambiente extracelular. B) APMV interagindo com a membrana celular. C) APMV ancorado as extrusões celulares. D e E) Grandes extensões celulares começam a internalizar a partícula de APMV. F) APMV sendo fagocitado. G e H) vesícula endocítica contendo APMV (fagossomo) dentro do citoplasma. I) Vesículas contendo partículas de APMV que ocasionalmente se fundiram.

Fonte: Ghigo *et al.*, 2008 – modificado.

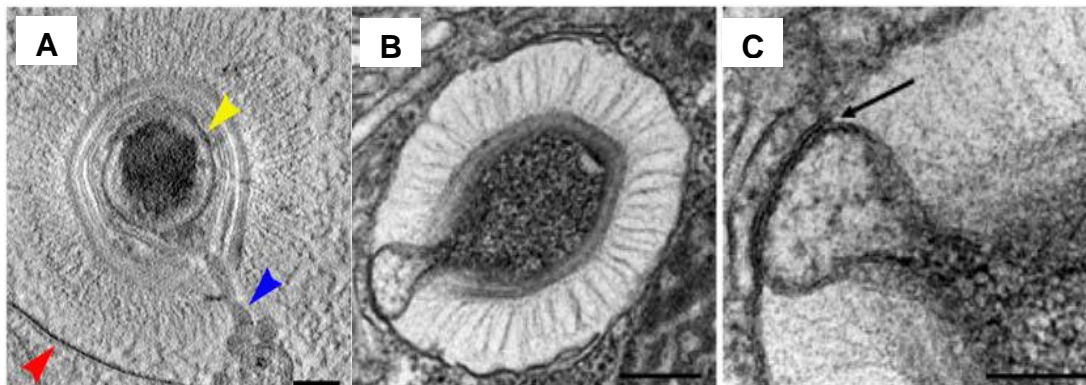


Figura 10: Tomografia eletrônica do APMV dentro de um fagossomo de uma *Acanthamoeba* infectada. (A) Pode-se observar a membrana delimitada do fagossomo (seta vermelha); o desnudamento inicial e protrusão da membrana interna do cerne (seta azul e seta preta); e o cerne interno (seta amarela); (B) Extrusão da membrana interna viral em direção à membrana do fagossomo; (C) Fusão da membrana viral com o fagossomo.

Fonte: Suzan-Monti *et al.*, 2007; Mutsafi *et al.*, 2010 – modificado.

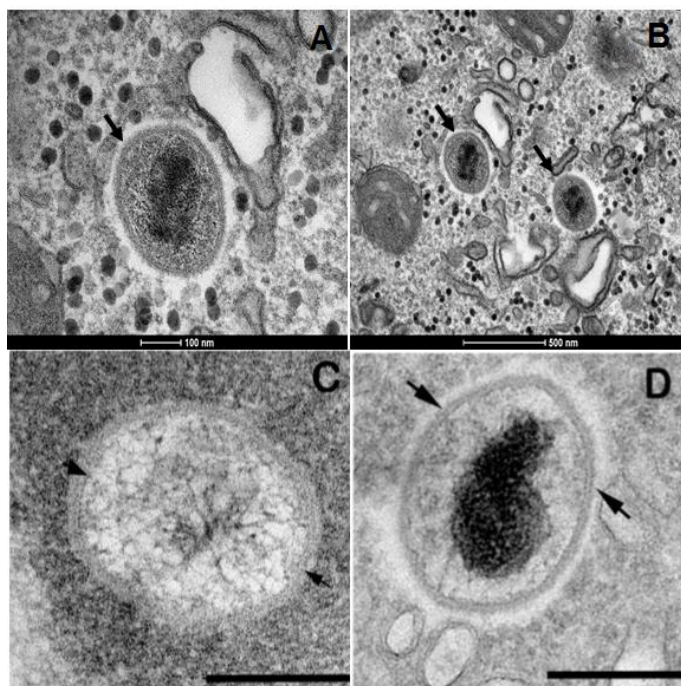


Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão de células de *A. castellanii* infectadas, demonstrando a presença de núcleos esféricos livres (sementes virais) no interior das células. (A-B) Amostra SCO6, isolado de água de ostra de Santa Catarina; (C) Megavirus e (D) Mimivirus.

Fonte: Andrade *et al.*, 2014; Arslan *et al.*, 2011 – modificado.

1.4.4. Importância clínica

Para uma grande proporção dos casos de pneumonia (20% - 50%), o agente etiológico não é indentificado. Isso pode ocorrer, em parte, pela inespecificidade dos métodos de diagnóstico ou por desconhecimento dos agentes etiológicos emergentes (LA SCOLA *et al.*, 2005; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007). Portanto, a identificação de novos agentes causadores de pneumonia na comunidade ou nosocomiais representa um importante problema de saúde pública (LA SCOLA *et al.*, 2005).

Algumas bactérias aquáticas e amebas de vida livre associadas são encontradas colonizando canais de abastecimento de água em ambientes hospitalares, e podem estar associadas tanto à pneumonia hospitalar quanto à pneumonia adquirida na comunidade. Alguns desses patógenos são estritamente intra-amebianos, como a *Legionella* sp. (HACKER *et al.*, 1993), e os mimivírus (LA SCOLA *et al.*, 2005).

Atualmente, os mimivírus são considerados possíveis agentes causadores de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes que estão em centros de terapia intensiva (CTI) e imunodeprimidos. A pneumonia associada à ventilação (VAP) causada por vírus é de difícil diagnóstico, porque esses agentes não são pesquisados em muitos dos casos, tendo, portanto, sua incidência provavelmente subestimada (VINCENT, LA SCOLA e PAPAIZIAN, 2010).

As evidências de que o APMV seria um possível agente causador de pneumonia, se fortaleceram após um técnico do laboratório do Dr. Didier Raoult que trabalhava com APMV desenvolver pneumonia subaguda, apresentando tosse seca, febre e dores no peito. Altos títulos de anticorpos anti-mimivirus foram detectados no soro deste técnico, exames de radiografia do pulmão indicaram a presença de infiltrado pulmonar, reforçando a suspeita de pneumonia (RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007).

Para estabelecer uma possível associação dos mimivírus com pneumonia, Khan e colaboradores (2006) inocularam camundongos com APMV por via intra-peritonal, e a partir de análises histopatológicas evidências de pneumonia aguda foram observadas. Em outro estudo, pesquisadores demonstraram indícios de que partículas de APMV seriam internalizadas por

macrófagos humanos e outras células fagocíticas através da fagocitose, levando a um ciclo produtivo de replicação viral (GHIGO *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que o APMV poderia causar pneumonia humana e, murina, sob condições experimentais (KHAN *et al.*, 2006; GHIGO *et al.*, 2008). Testes sorológicos também foram realizados por diversos pesquisadores, através dos quais foi possível observar a presença de anticorpos contra APMV em vários pacientes (LA SCOLA *et al.*, 2005; BERGER *et al.*, 2006; RAOULT *et al.*, 2006; LARCHER *et al.*, 2006; DARE *et al.*, 2008; VINCENT, LA SCOLA E PAPA ZIAN, 2010; VAN SPAUWEN *et al.*, 2012).

Em 2013, pesquisadores conseguiram isolar partículas virais infecciosas de mimivírus a partir de diferentes amostras humanas. Em um dos estudos, Saadi e colaboradores (2013a) isolaram um mimivírus (LBA111) a partir de amostras pulmonares de um paciente tunisiano de 72 anos com pneumonia. Em outro estudo do mesmo grupo, foi isolado um mimivírus (*Shanvirus*) de fezes de um paciente com pneumonia (SAADI *et al.*, 2013b).

Recentemente, Colson e colaboradores (2013a) detectaram a presença de sequências gênicas de APMV em fezes humanas durante um estudo de metagenômica. E um estudo de Silva e colaboradores (2013), sugere que o APMV é capaz de interagir com o sistema interferon humano e codifica moléculas de evasão do sistema imune. No entanto, mais estudos são necessários para demonstrar que os mimivírus são realmente agentes causadores de pneumonia.

Alguns estudos também detectaram a presença de material genético e de anticorpos contra outros vírus gigantes em amostras clínicas ao analisarem o viroma humano. Além disso, vírus da família *Marseilleviridae*, como o Senegal vírus e o *Giant Blood Marseillevirus*, também já foram isolados de amostras de sangue e fezes de indivíduos assintomáticos. Esses dados, juntamente com outros estudos que detectaram a presença do genoma de APMV em macacos e bovinos, assim como os que demonstraram que o APMV é reconhecido pelo sistema imune de vertebrados e estimula o sistema interferon, sugerem que organismos vertebrados poderiam ser possíveis hospedeiros para os vírus gigantes (GOODMAN, 2013; POPGEORGIEV *et al.*, 2013a; POPGEORGIEV *et al.*, 2013b; POPGEORGIEV *et al.*, 2013c; SILVA *et al.*, 2013; DORNAS *et al.*, 2014; ABRAHÃO *et al.*, 2014).

Diante dessa controvérsia e de algumas questões ainda não respondidas em relação à atuação dos vírus gigantes como patógenos humanos, ou até mesmo como organismos comensais, estudos adicionais e mais abrangentes são necessários (RAOULT *et al.*, 2007).

1.5. Virófagos

Em 2008, La Scola e colaboradores identificaram pequenas partículas icosaédricas, com cerca de 50 nm de diâmetro, em fábricas virais no citoplasma de amebas infectadas com mamavírus. Essas diminutas partículas receberam o nome de *Sputnik virus*. Quando inoculado sozinho em *A. castellanii*, o *Sputnik virus* não consegue se multiplicar, mas na presença do vírus gigante, mamavírus ou APMV, ele se multiplica na mesma fábrica viral do vírus gigante. Em algumas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, os pesquisadores observaram o Sputnik dentro do mamavírus e que em co-infecção são formadas partículas defectivas do vírus gigante hospedeiro, sendo então denominados virófagos, ou seja, vírus que infectam outros vírus (Fig. 12) (LA SCOLA *et al.*, 2008). Eles utilizam a polimerase do vírus gigante para se multiplicar, levando assim, a uma diminuição nas taxas de multiplicação dos vírus gigantes (LA SCOLA *et al.*, 2008).

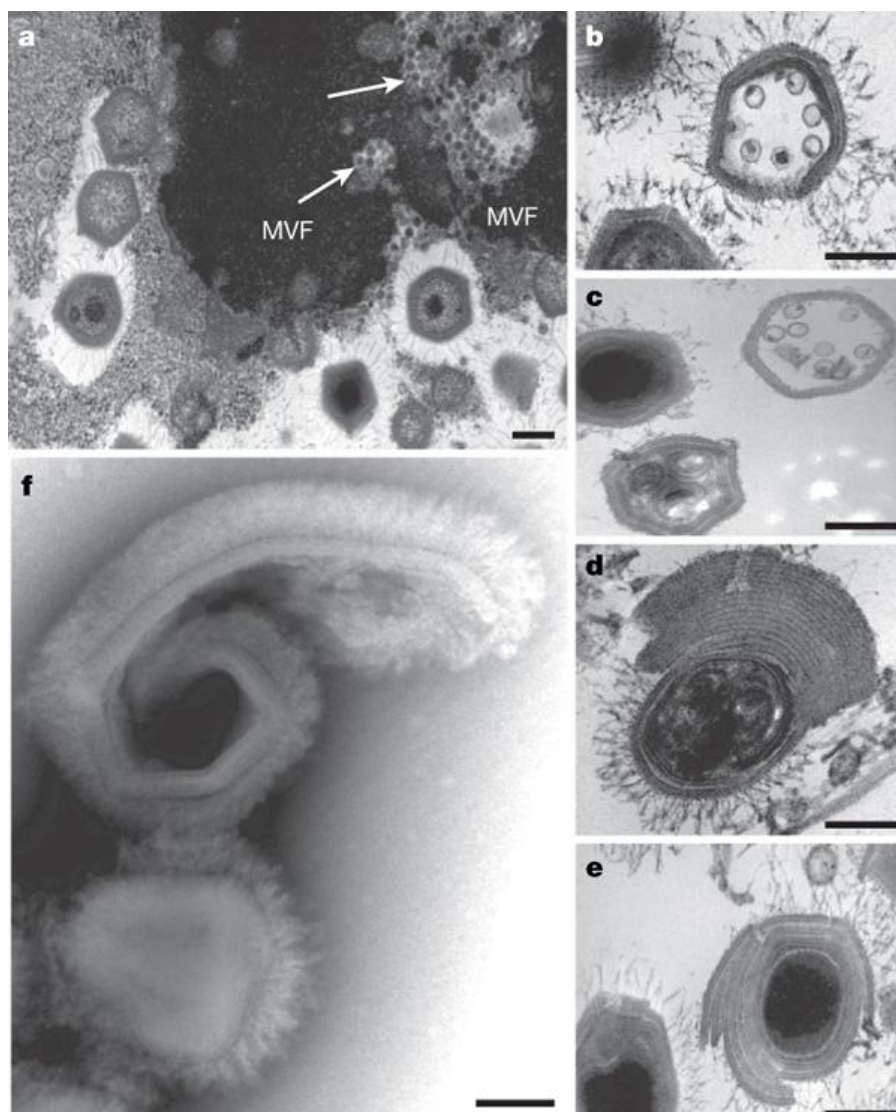


Figura 12: Microscopia eletrônica de partícula virófagos. (A) fábrica viral de mamavírus com partículas virais em diferentes estágios de maturação; agregados de *Sputnik virus* são observados na fábrica viral. (B) *Sputnik virus* dentro dos capsídeos de mamavírus. (C) partículas defeitivas. (D-F) co-infecção de mamavírus e *Sputnik virus* resulta em morfologia alterada do vírus, com (D) acúmulos de membrana em um lado, (E) ao redor da partícula ou (F) partículas abertas.

Fonte: La Scola *et al.*, 2008 – modificado.

Outros virófagos também já foram identificados em vírus gigantes de outras famílias. O mavirus é um virófago que parasita *Cafeteria roenbergensis virus* (FISCHER e SUTLLE, 2011). O *Organic lake virus* (OLV) é um virófago que parasita phycodnavirus (vírus que infectam algas) e controla assim o crescimento de algas prasinófitas em lagos antárticos hipersalinos e de água

doce (YAU *et al.*, 2011). O *Sputnik 2 virus* é um virófago que parasita o *Lentille virus*, ambos isolados a partir de fluídos de lentes de contato de um paciente com queratite (DESNUES *et al.*, 2012). No Brasil, foi isolado juntamente com o *Samba virus* o quinto virófago, denominado *Rio Negro virus* (CAMPOS *et al.*, 2014).

Embora o conceito de virófago tenha sido criticado duramente por alguns autores, que acreditam que esses sejam apenas novos vírus satélites (KRUPOVIC e CVIRKAITE-KRUPOVIC, 2012), a maioria dos autores concordam que esses vírus são diferentes dos vírus satélites canônicos, pois diminuem a infectividade do vírus gigantes hospedeiros, deixando-o “doente” (FISCHER e SUTTLE, 2011).

Acredita-se que os virófagos compartilham uma origem comum entre si e provavelmente são parasitas comuns de vírus gigantes de DNA (DESNUES *et al.*, 2012).

1.6. Ecologia dos mimivírus

Vírus são organismos ubíquos, sendo encontrados em qualquer ambiente onde a vida está presente. Os vírus infectam quase todos os organismos vivos, desde bactérias a baleias e até mesmo outros vírus. Alguns estudos sugerem que exista cerca de 10^{31} partículas virais a cada mililitro de água dos oceanos, o que causa a morte de aproximadamente 20% da biomassa marinha por dia (SUTTLE, 2005; SUTTLE, 2007). Apesar disso, pouco se conhece a respeito do papel dos vírus na maioria dos ecossistemas (GHEDIN e CLAVERIE, 2005; ROHWER *et al.*, 2009).

Os phicodnavírus, por exemplo, infectam algas marinhas e controlam a floração de espécies distribuídas globalmente. De forma semelhante, acredita-se que os mimivírus controlem a população de amebas no ambiente, e participem da ciclagem de nutrientes. Os mimivírus também podem atuar seletivamente, impulsionando aspectos evolutivos de muitos organismos, ou participando no processo de aquisição de genes através de TGH (YAU *et al.*, 2010; YAMADA, 2011). O processo de aquisição de genes pode ser explicado no caso dos mimivírus, por apresentarem genes que codificam proteínas

envolvidas na tradução, proteínas comuns aos três domínios (*Eukarya*, *Archea* e *Bacteria*), entre outras características peculiares (FORTERRE, 2010).

Após o descobrimento de APMV, novos vírus do grupo foram descobertos nos mais diversos locais e ambientes. Por exemplo, em amostras de água do mar (*Cafeteria roenbergensis virus*, *Megavirus chilensis*); em amostras de águas de rio e lago (*Courdo11virus*); lentes de contato (*Lentille virus*); solo (*Terra 1 virus*) (LA SCOLA *et al.*, 2010; ARSLAN *et al.*, 2011; ETTEN, 2011; COLSON *et al.*, 2013a). Além dos mimivírus, novos vírus gigantes têm sido descobertos, como *Pandoravirus salinus* e *Pandoravirus dulcis* (PHILIPPE *et al.*, 2013); e o mais recente *Pithovirus sibericum* (LEGENDRE *et al.*, 2014).

No ano de 2013, de acordo com o ICTV (2014), 2827 espécies virais já foram catalogadas, e com o advento dos projetos de metagenômica ambiental, há maiores chances de se encontrar novos vírus gigantes em qualquer ambiente.

1.7. Evolução e o quarto domínio da vida

Análises de sequências moleculares têm permitido identificar parcialmente as origens dos genes de diferentes organismos. Na década de 1970, uma suposta árvore da vida baseada em análises de genes ribossomais foi postulada por Carl Woese, a qual inclui os três domínios: *Eucarya*, *Bacteria* e *Archaea*. Os vírus não foram incluídos neste sistema de classificação, por supostamente não possuírem genes que possam ser comparados para tal classificação. Todavia, com a descoberta dos mimivírus, que compartilham características semelhantes com células eucarióticas, um intenso debate se iniciou a respeito da natureza dos vírus no contexto da evolução e biodiversidade (FORTERRE, 2010). Estudos identificaram um conjunto de proteínas presentes em todas as formas de vida, incluindo organismos celulares e vírus, principalmente em vírus gigantes, e esse conjunto de proteínas virais e celulares foi utilizado para realizar reconstruções filogenéticas (MOREIRA e LOPEZ-GARCIA, 2009; BOYER *et al.*, 2010)

Baseado em análises de genes que participam da biossíntese do DNA, por serem conservados em todos os organismos vivos e nos vírus gigantes, e

em outras análises anteriormente citadas, pesquisadores propuseram a criação de um quarto domínio em que os vírus gigantes seriam o quarto ramo (Fig. 13). Os resultados desse estudo sugeriram a existência de uma fonte única ancestral desses genes, e permitiu especular que eles tenham surgido simultaneamente ou imediatamente após o surgimento das linhagens eucarióticas modernas (BOYER *et al.*, 2010).

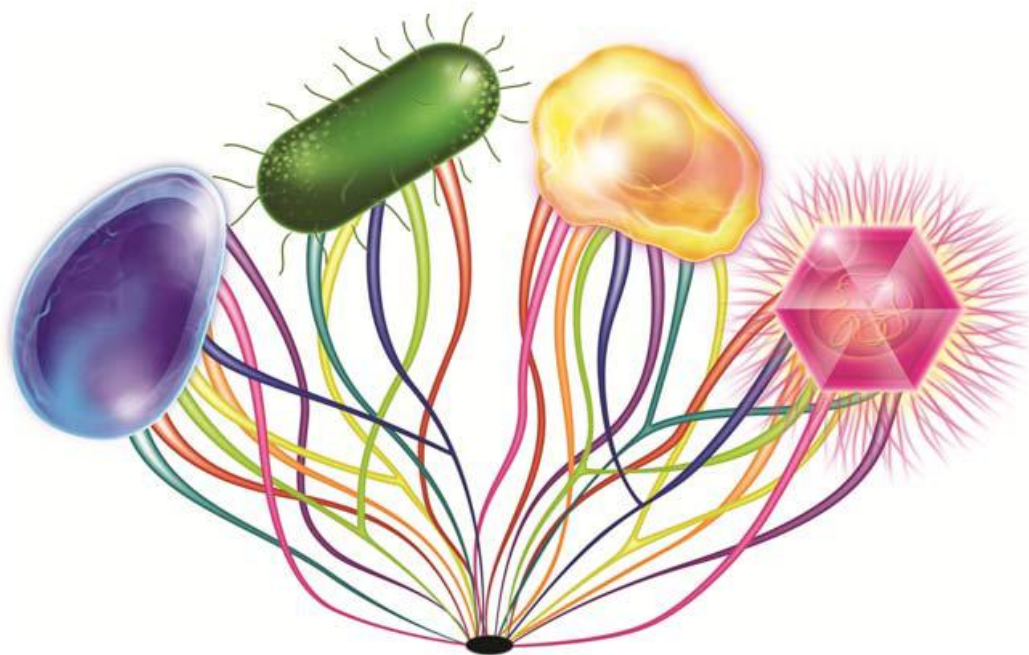


Figura 13: Representação esquemática dos quatro domínios propostos com uma origem comum. Essa figura representa espécies de cada domínio da vida, sendo que: eucariotes (célula amarela), bactérias (célula verde), archaeas (célula azul), e vírus (mimivírus em rosa). Cada linha colorida representa uma proteína diferente, sendo que as bifurcações representam uma provável transferência gênica lateral. Além disso, esta figura ilustra que todos os organismos compartilham um conjunto de genes comuns envolvidos no processamento do DNA, que evoluíram a partir de uma única origem ancestral.

Fonte: Boyer *et al.*, 2010 – modificado.

Outros pesquisadores acreditam que os genes utilizados para incluir os vírus gigantes na árvore da vida tenham sido adquiridos por TGH de diversas fontes, resultando em um sinal filogenético inconsistente para que estes organismos possam ser agrupados na árvore da vida (WILLIAMS *et al.*, 2011). Além disso, membros de diferentes famílias virais apresentam diversidade nos constituintes do capsídeo e conteúdos gênicos, sugerindo assim que os vírus

têm várias origens evolucionárias, ou seja, são polifiléticos (MOREIRA e LÓPEZ-GRAVIA, 2009).

1.8. Gênero *Acanthamoeba*

Amebas de vida livre (AVL) já foram consideradas organismos inofensivos e simbioses de mamíferos. Atualmente, são considerados patógenos emergentes, associados a diversas doenças em seres humanos e animais (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; VISVESVARA *et al.*, 2007).

As amebas do gênero *Acanthamoeba* estão entre as AVL mais encontradas no ambiente. Este gênero foi descrito pela primeira vez por Castellani em 1930, quando foi relatada a presença de uma ameba em um cultivo de *Cryptococcus pararoseus*. No entanto, só em 1931 foi estabelecido seu gênero, que abriga amebas que apresentam inúmeras projeções espinhosas, superficiais, conhecidas como acantopódios (CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

Estas amebas têm despertado a preocupação e o interesse de pesquisadores pelo fato de poderem internalizar diferentes espécies de microorganismos. Este fato pode representar um problema de saúde pública, considerando que as amebas são resistentes ao processo de cloração da água e podem proteger o microorganismo fagocitado, constituindo-se em um reservatório para infecções humanas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHEID *et al.*, 2010; BORATTO *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Acanthamoeba* estão entre os protozoários mais encontrados na natureza. Estão distribuídas mundialmente e têm sido isoladas de amostras de solo, poeira, ar, água doce natural e tratada, água do mar, piscinas, águas residuais, sedimentos, ar-condicionado, hospitais, lentes de contato, cultivos celulares, unidades de diálise, estações de lavagem de olhos e até mesmo da Antártida. Também podem ser encontradas em cavidades nasais, garganta, faringe, tecidos pulmonares, lesões de pele, fezes humanas, córnea, urina e fluidos cerebrais de indivíduos aparentemente saudáveis e de pacientes imunodeficientes (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

O ciclo de vida das espécies de *Acanthamoeba* envolve os estágios: trofozoíto e cisto (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013). No entanto, ambas as formas são reconhecidas por sua ampla tolerância a uma grande variedade de ambientes. O trofozoíto é a forma de locomoção e de alimentação ativa da ameba, a reprodução destes organismos ocorre por divisão binária. A ameba na forma de cisto possui a vantagem de sobreviver e resistir às condições ambientais mais adversas como dissecação, inanição e agentes físicos e químicos como produtos de higiene e limpeza, antimicrobianos, aquecimento, refrigeração e radiação ultravioleta (AKSOZEK *et al.*, 2002). Estudos indicam que nesta forma podem sobreviver *in vitro* por até 20 anos ou mais (MAZUR *et al.*, 1995).

O gênero *Acanthamoeba* consiste de 17 genótipos (T1 – T17), mas o genótipo T4 tem sido mais frequentemente associado com infecções que acometem mais comumente indivíduos imunocomprometidos (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; revisado por KHAN, 2012; MARTINEZ e VISVESVARA, 1997; revisado por AQEEL *et al.*, 2013).

Apesar de serem caracterizadas como amebas de vida livre, algumas espécies desse gênero, principalmente *A. polyphaga* e *A. castellanii*, podem ser consideradas como patógenos oportunistas e causar algumas doenças em humanos, principalmente em imunocomprometidos. O primeiro indício de que *Acanthamoeba* poderia causar infecções em humanos foi em 1958, durante ensaios clínicos da vacina contra poliomielite. Os tipos de infecções mais comuns observadas incluem infecções disseminadas (cutâneas e nasofaríngea), queratites e encefalite amebiana granulomatosa (EAG) (rara, mas fatal) (SIDDIQUI e KHAN, 2012; CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

Além de sua própria patogenicidade, as amebas também podem atuar como ‘cavalos de Tróia’ e servem como plataformas de replicação de outros microrganismos patogênicos, incluindo bactérias como *Legionella* spp, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* sp, *Borrelia* sp, *Bartonella* sp, *Chlamydia* spp, e leveduras, como *Cryptococcus neoformans*. Além disso, espécies de *Acanthamoeba* são hospedeiros naturais para os mimivírus e para outros vírus gigantes, como os marseillevírus, pandoravírus e pithovírus. Dessa maneira, o interior da ameba se torna um ambiente propício para a ocorrência de transferência gênica lateral entre vírus e bactérias, e por esse motivo as

amebas são conhecidas como “melting pots” propiciando o advento de organismos quiméricos (VISVESVARA e SCHUSTER, 2008; RAOULT E BOYER, 2010; BORATTO *et al.*, 2013).

1.9. Biologia das Ostras

Ostras são organismos invertebrados pertencentes ao filo *Mollusca*, classe *Bivalvia*, família *Ostreidae*. Os bivalves são moluscos marinhos ou de águas doces, primariamente micrófagos ou suspensívoros, ou seja, se alimentam de matéria particulada em suspensão trazida por correntes de água. O processo de filtragem da água é bastante eficiente, algumas espécies de ostra podem filtrar 37 litros de água por hora e reter partículas de tamanho tão pequeno quanto 1µm (BRUSCA e BRUSCA, 2011).

As ostras de maior importância econômica pertencem ao gênero *Crassostrea*, devido ao valor alimentício da carne e ao uso da concha como matéria prima na fabricação de produtos industriais e medicinais. A ostra é considerada um organismo com alto valor nutritivo devido ao teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), glicogênio, vitaminas (A, B1, B2, C e D) e proteínas. A maricultura está surgindo como uma das culturas mais rentáveis em termos de importância nutricional e econômica em todo o mundo. A rápida aceleração da atividade no Brasil aliada à falta de saneamento ambiental, especialmente em lugares onde os bivalves são colhidos, sem quaisquer procedimentos de limpeza padrão, surge como uma preocupação importante relacionada com o seu cultivo e produção (GUIGUET LEAL e FRANCO, 2008; FAO, 2012; DIEGO *et al.*, 2013).

Por possuírem a capacidade de reter partículas, as ostras podem ser usadas como bio-indicadores de contaminação de águas e seu consumo pode resultar em riscos à saúde humana, especialmente para populações imunocomprometidas (SINCERO *et al.*, 2006; CORRÊA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Vírus são parasitas de toda forma de vida celular. A descoberta e análise da sequência genômica dos mimivírus, os maiores do grupo dos vírus núcleo-citoplasmáticos de DNA, contestou grande parte dos dogmas aceitos em relação ao vírus. Estes vírus apresentam um maquinário próprio capaz de codificar genes para replicação de seu genoma, com considerável autonomia em relação à célula hospedeira, portanto seu estudo pode responder muitas questões acerca da evolução e origem dos vírus. Por terem sido isolados a partir de ambiente hospitalar e associados a amebas de vida-livre, também apresentam uma importância no âmbito médico, por serem considerados possíveis agentes de pneumonia. Os vírus gigantes ficaram negligenciados por muito tempo, mas atualmente com os avanços nas técnicas de biologia celular e molecular que permitem isolar e caracterizar novos organismos, a comunidade científica vem aprofundando o conhecimento acerca destes, com o objetivo de entender a biologia e evolução dos mesmos. Amebas do gênero *Acanthamoeba* são hospedeiros naturais dos mimivírus e apresentam uma ampla distribuição na natureza, portanto este estudo visa isolar e caracterizar molecular e biologicamente novos vírus gigantes presentes em amostras de ostras e água do mar de três regiões do litoral brasileiro (Santa Catarina, Rio Grande do Norte e Bahia). No ambiente marinho, as ostras merecem atenção sobre prospecção viral, devido a sua capacidade de filtração, podendo assim acumular em seus corpos componentes químicos e microrganismos presentes nas águas ao seu redor. Desta forma, o isolamento de mimivírus a partir de ostras é importante não somente para aumentar nosso conhecimento a respeito da biologia desses vírus, como também para levantar questões sobre as ostras serem uma possível fonte para a infecção por APMV em humanos através de seu consumo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de isolados de mimivírus em amostras de ostras e água do mar de três regiões do litoral brasileiro.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar vírus gigantes a partir de diferentes amostras ambientais;
- Caracterizar biologicamente os vírus isolados;
- Caracterizar molecularmente os vírus isolados;
- Analisar filogeneticamente os vírus isolados e as possíveis sequências nucleotídicas obtidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Meios de cultura

4.1.1.1. Meio PYG

O meio de cultura PYG (meio protease peptona extrato de levedura e glicose) é o meio utilizado para o cultivo de AVL. Composto por sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck, Alemanha), 0,5 μM de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (Merck, Alemanha), 5 nM de sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ($Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$) (Merck, Alemanha), 1,4 mM de fosfato dibásico de sódio heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck, Alemanha), 2,5 mM de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) (Merck, Alemanha), 3,4 mM de citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Merck, Alemanha), 20g de protease peptona (extrato bactopectona) (Merck, Alemanha,) 0,05 M de glicose (Merck, Alemanha), água q.s.p.. Com pH ajustado em 6,5. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, e após o resfriamento submetido à filtração em filtros de 0,22 μm para retirada de eventuais cristais. O meio foi armazenado em câmara fria (temperatura de 4 a 8°C) até o uso. Foi realizado também teste de esterilidade colocando 1 mL do meio em 9 mL de meio tioglicolato, por 7 dias a 37°C. Para uso, o meio foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 7%, (Cultilab, Brasil), 200 U/mL de Penicilina (Cristália, Brasil), 50 μg /mL de Gentamicina (Sigma, EUA) e 2,5 μg /mL de Anfotericina B (Sigma, EUA). As quantidades em gramas e volumes utilizados no preparo do meio estão na tabela 1 do Anexo I.

4.1.1.2. Meio Água-arroz

O meio água-arroz é utilizado para o enriquecimento das amostras, como descrito por Arslan *et al.* (2011). A solução foi preparada colocando 40 grãos de arroz em 1 litro de água deionizada e então autoclavada a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento o meio foi armazenado em câmara fria (temperatura de 4 a 8°C) até o uso.

4.1.2. Sistemas celulares

4.1.2.1. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010)

AVL pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são hospedeiros de APMV e outros vírus gigantes. Para o isolamento de vírus gigantes eventualmente encontrados nas amostras testadas, foram utilizadas amebas da espécie *A. castellanii* originada da *American Type Culture Collection* (ATCC 30010) (Maryland, E.U.A.). Para o cultivo das amebas foram utilizadas garrafas de cultivo celular (TPP, Suíça), contendo as células em meio PYG suplementado com 7% SFB e incubadas a 32°C, totalmente vedadas. Subcultivos posteriores foram feitos de três em três dias, ou dependendo da confluência da monocamada. Para facilitar o desprendimento da monocamada da superfície da garrafa, as mesmas foram colocadas por 5 minutos em banho de gelo. Em seguida, o volume da garrafa foi vertido em um frasco, ressuspenso e com o auxílio de uma câmara de Neubauer as células foram contadas e após os cálculos a solução de amebas foi dividida em novas garrafas. As células de *A. castellanii* cultivadas serviram para testes de isolamento viral, titulação, multiplicação, avaliação de infectividade, purificação, controle negativo para ausência de vírus em reações em cadeia da polimerase (PCR), entre outros testes que foram realizados.

4.1.3. Vírus

4.1.3.1. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV)

Amostras APMV foram gentilmente cedidas pelos Dr. Didier Raoult e Dr. Bernard La Scola (Universidade de Marselha, França). Multiplicações posteriores deste vírus foram realizadas de acordo com a necessidade de uso nos testes biológicos e moleculares.

4.2. Métodos

4.2.1. Coleção de amostras

Neste estudo foram utilizadas 108 amostras, sendo 18 amostras de ostras e 10 amostras de água do mar, oriundas de Santa Catarina; 20 amostras de ostras e 20 amostras de água do mar, oriundas do Rio Grande do Norte; e 20 amostras de ostras e 20 amostras de água do mar, oriundas da Bahia. As ostras utilizadas neste estudo foram do gênero *Crassostrea* e apresentavam uma aparência sadia. As amostras foram cedidas pela professora Célia Barardi, da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras de ostra e água interna da concha foram dispostas em 3 ou 4 frascos de 50mL, e as amostras de água do mar foram dispostas em frascos de 2mL. As coletas foram realizadas no período de 2012 a 2013.

4.2.2. Preparo das amostras

As amostras de ostras foram maceradas em nitrogênio líquido, e em seguida ressuspendidas em aproximadamente 10 mL de solução PBS. Da solução de ostra macerada foram utilizados 500 µl e adicionados a 4,5 mL de meio água-arroz. Outra fração das amostras de ostras também foi utilizada, a água que fica retida dentro da concha. Essas amostras foram homogeneizadas por aproximadamente 15 segundos em agitador, e então 1 mL foi adicionado a 9mL do meio água-arroz. As amostras foram armazenadas em local escuro, à temperatura ambiente por 30 dias.

A razão de deixar as amostras incubadas em local escuro é para eliminar microrganismos autotróficos, enquanto permite o crescimento de microrganismos heterotróficos, que servem de alimento para as amebas, permitindo assim uma eventual multiplicação de vírus gigantes (ARSLAN *et al.*, 2011).

4.2.3. Enriquecimento das amostras

Para todas as amostras, após 5 dias, foram adicionadas 5.000 amebas e as amostras foram novamente incubadas em local escuro à temperatura ambiente. Após 20 dias do início do enriquecimento, foram adicionadas mais

5.000 amebas, e as amostras foram incubadas novamente seguindo a mesma metodologia inicial. Ao final de 30 dias de enriquecimento, as amostras enriquecidas foram filtradas em filtros de 1,2 micrômetros (Millipore, EUA) para que as impurezas fossem retiradas, e em seguida uma nova filtragem foi realizada utilizando filtros de 0,2 micrômetros para a retenção de vírus gigantes. O filtro de 0,2 micrômetros foi então colocado em microtubos com 600 µl de PBS para eluição dos vírus. O sobrenadante foi inoculado em culturas de amebas e foi feito o monitoramento para observar efeito citopático, como arredondamento.

4.2.4. Isolamento

Para o isolamento dos possíveis vírus encontrados após o enriquecimento e filtragem, foram realizadas 3 passagens 'cegas', sendo que a primeira foi realizada em placas de 24 poços contendo 100.000 amebas/poço e inoculando 100 µL de amostra enriquecida. A segunda e terceira passagens foram feitas em placas de 96 poços contendo 40.000 amebas/poço e inoculando 100 µL de cada amostra. As passagens foram realizadas com um intervalo de 4 dias de incubação. Os poços que por ventura, apresentaram efeito citopático foram raspados, e submetidos a 3 ciclos de congelamento/descongelamento (nitrogênio líquido/banho-maria 37°C), facilitando assim a liberação dos vírus por lise celular.

4.2.5. Multiplicação viral (La Scola *et al.*, 2003)

Para multiplicação viral, amostras de APMV ou dos vírus gigantes isolados, foram utilizados para infectar monocamada de amebas da espécie *A. castellanii*, com uma confluência de cerca de 90%, utilizando uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 0,01. Para isto, o meio da garrafa foi descartado e a solução viral (eluída em PBS) foi vagarosamente adicionada sobre a monocamada. Após uma hora de adsorção foi adicionado à monocamada 25 mL de meio PYG suplementado. As garrafas contendo o inóculo viral foram mantidas a 32°C, completamente vedadas. O efeito citopático foi avaliado entre três e quatro dias após infecção, e quando

necessário o sobrenadante e os fragmentos celulares foram coletados para purificação viral.

4.2.6. Purificação (La Scola *et al.*, 2003)

Para a purificação dos vírus gigantes, a multiplicação viral em cultura celular utilizando amebas da espécie *A. castellanii* foi realizada com uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 0,01. Foram aguardados 4 dias para que a maioria das amebas estivessem lisadas. O meio das garrafas foi coletado em frascos e submetidos a 3 ciclos de congelamento /descongelamento (nitrogênio líquido/banho-maria 37°C), para lisar amebas que ainda estivessem com membrana íntegra. O lisado então foi submetido a outro ciclo de lise utilizando o homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. Em seguida, a solução foi filtrada em membranas de 1,2 µm (Millipore, EUA) para a retenção de lisado e debris celulares. Em tubos para ultra-centrífuga *CombiSorvall Rotor AH-629va*, foram adicionados 10 mL de uma solução de sacarose 22% (Merck, Alemanha) e gotejado, vagarosamente, 25 mL do lisado filtrado. Esses tubos foram então, submetidos a centrifugação a 14.000 rpm, por 30 minutos, entre 4°C e 8°C, para sedimentar as partículas virais. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de PBS. Alíquotas da solução viral eluídas foram feitas, identificadas e estocadas à -80°C.

4.2.7. Titulação viral (La Scola *et al.*, 2003)

O título viral foi obtido pelo método de TCID₅₀, e calculado segundo Reed-Muench (1938). Placas de 96 poços contendo aproximadamente 40.000 amebas/poço foram utilizadas para realizar este ensaio após atingirem uma confluência de 80%. As amostras virais foram diluídas em meio PYG de forma seriada, razão de 10 (10⁻¹ a 10⁻¹⁰). Em seguida, foi adicionado 50µL de cada diluição por poço, em quadruplicata. Após 1 hora de adsorção a 32°C, um total de 150µL de meio PYG suplementado foi adicionado em cada poço, e a placa foi completamente vedada. Uma quadruplicata de poços foi reservada como controle de viabilidade de amebas. Cada poço foi monitorado diariamente, para a observação de efeito citopático como arredondamento, vacuolização, perda

de motilidade e lise celular. O cálculo do título pelo método de TCID₅₀/mL foi realizado após 4 dias de incubação.

4.2.8. Teste de resistência a UV e temperatura

Para o teste de resistência à temperatura, foram adicionados em um microtubo com 200 µl de PBS, 10⁶ TCID₅₀/mL de APMV ou de outros vírus gigantes isolados. Os vírus foram aquecidos a 70°C, utilizando o equipamento Eppendorf Thermomixer, por diferentes tempos (um, cinco, sete e dez minutos) e em seguida foram titulados. A temperatura utilizada neste teste foi escolhida com base na temperatura média da superfície das águas em que esses organismos filtradores são encontrados, e baseado em testes preliminares observamos que em temperaturas acima de 70°C ocorre a desnaturação do capsídeo viral. Além disso, a mesma quantidade de partículas virais foi utilizada para o teste de resistência à luz UV, no qual foi adicionado a placas de 6 poços 1 mL de solução viral, sendo o conteúdo exposto a luz UV (intensidade 15 W, distância entre a placa e a luz UV de 15 cm) por diferentes tempos (um, cinco, sete e dez minutos), utilizando um transiluminador de luz UV. Posteriormente o conteúdo foi coletado para titulação. Os experimentos de resistência foram feitos em duplicata.

4.2.8. Curva de Ciclo Único

Para avaliar o perfil de crescimento dos vírus isolados em comparação ao APMV, foram realizados ensaios de curva de ciclo único, nos quais monocamadas contendo aproximadamente 2 x 10⁵ amebas contidas em placas de 24 poços com confluência de aproximadamente 80% foram infectadas com o vírus gigante isolado utilizando uma M.O.I. de 10. A adsorção foi feita por 1 hora, e a cada 15 minutos a placa foi homogeneizada. Após, o inóculo foi cuidadosamente todo retirado e, foi novamente adicionado 1mL de meio PYG e incubado a 32°C. Foram realizadas coletas em diferentes tempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas). A monocamada foi desprendida com auxílio de um raspador e essa suspensão foi submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento,

e posteriormente foi realizada a titulação viral de cada tempo, de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.7.

4.2.9. Eletroforese em PAGE

Após fervura em tampão de amostra (20% glicerol, 20% SDS, 0,375M Tris pH 8,8, 0,75M, mercaptoetanol e 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol) (Sigma, EUA), as amostras foram separadas por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida bifásico a 10% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 30:0,8) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%). O fracionamento foi feito por 3 horas a 100V. Como marcador de tamanho molecular foram utilizados padrões de proteínas de tamanho conhecido (Precision Plus Protein™ Prestained Standards, Bio-Rad), possuindo massas moleculares de 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75 e 100 kDa. O gel foi corado em solução coomassie blue (0,25% p/v do corante coomassie blue R 250 (Sigma, EUA) durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, foi descorado por 2 horas em solução fixadora I (metanol 40%, ácido acético 10%, água 50%) e então transferido para outra solução descorante por 2 horas, fixadora II (etanol 10%, ácido acético 5%, água 85%) até a visualização das bandas, ao fundo do gel. O gel foi desidratado entre duas folhas de papel celofane e preso sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente, durante 48 h.

4.2.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amebas da espécie *A. castellanii* foram infectadas na M.O.I. de 0,01 com APMV ou vírus gigante isolado. Como controle foram utilizadas amebas não infectadas. Após 36 horas de infecção, foi retirado todo o meio e a monocamada de amebas foi lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1M. A solução foi totalmente retirada e foi adicionada uma solução fixadora à base de glutaraldeído tipo 1, 2,5% por uma hora à temperatura ambiente. A monocamada de amebas foi retirada utilizando um raspador e centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos a 4°C, o sedimento formado foi transferido para um microtubo no qual foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As

secções ultrafinas foram realizadas pelo Centro de Microscopia da UFMG e foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão. O protocolo do preparo das soluções utilizadas está no Anexo II.

4.2.10. Extração do DNA viral (Sambrook e Russell, 1989)

O DNA total das amostras foi extraído utilizando uma solução de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (PCI), na proporção de 25:24:1, respectivamente. Para tanto, 100 µl de cada amostra processada foi previamente incubado à 75°C, por uma hora, para favorecer a desnaturação do capsídeo viral e, conseqüente liberação do material genético. Após, foram acrescentados 300 µl de PBS e mais 400 µl da solução de PCI. Essa mistura foi então vortexada, por aproximadamente 10 segundos, e centrifugada, á temperatura ambiente, a 13.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação e aguardados mais 10 minutos, a fase superior foi cuidadosamente coletada, medida, com o auxílio de uma micropipeta, e cuidadosamente transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do material genético foi adicionado 2,5 vezes o volume coletado do sobrenadante de etanol absoluto (96%) gelado e 0,1 vezes o volume coletado do sobrenadante de acetato de sódio pH 5,5 a 3M. Em seguida, essa mistura foi homogeneizada, invertendo o microtubo cinco vezes, e centrifugada a 13.000 RPM por 5 minuto a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi descartado por inversão e o tubo foi mantido aberto, em estufa, para evaporar o restante do etanol. O *pellet* gerado, foi então ressuspendido com 50µL de água estéril aquecida à 37°C e a qualidade e concentração de DNA foi então dosada em Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2.11. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Para a realização do teste de PCR, foram utilizados iniciadores construídos a partir da sequência do gene conservado da RNA helicase do APMV (Tabela 3). A PCR em tempo real foi feita utilizando mix comercial (Applied Biosystems, EUA), iniciadores específicos (4 mM de cada), 1µl de amostra e água totalizando 10µl de reação. As condições térmicas utilizadas para a amplificação foram as utilizadas seguindo o programa padrão da

máquina StepOne (Applied Biosystems, EUA), com temperatura de pareamento de 60°C.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real (CAMPOS et al., 2014).

Oligonucleotídeo	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Tamanho <i>amplicon</i>
<i>RNA Helicase</i>	ACCTGATCCACATCCCATAACTAAA	GGCCTCATCAACAAATGGTTTCT	85 pb

4.2.12. Sequenciamento e análises de sequências

O sequenciamento dos fragmentos obtidos no item 11, foi feito pelo método de Dideoxi descrito por Sanger e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando o Kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Megabace e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Para cada fragmento foram feitas quatro reações de sequenciamento, sendo duas para cada um dos iniciadores. As sequências obtidas foram sobrepostas e a obtenção do consenso foi feita utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2010). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool) (ALTSUCHL et al, 1990). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BLASTN. As sequências de nucleotídeos analisadas foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 4.1 (KUMAR et al., 1994).

5. RESULTADOS

5.1. Detecção viral a partir das amostras de ostras

5.1.1. Isolamento

Em um recente estudo, foi observado que a técnica de enriquecimento favorece o aumento da eficiência do isolamento (DORNAS *et al.*, 2014b). Portanto, neste trabalho, foi utilizado o processo de enriquecimento para o isolamento de novos vírus gigantes semelhantes ao mimivírus. Em 23 (21.3%) das 108 amostras testadas, foram observados efeitos citopáticos como arredondamento celular e lise da membrana celular, após 4 dias de incubação a 32°C. Nas 85 (78.7%) amostras restantes nenhum efeito foi observado, as amebas continuaram íntegras na forma de trofozoíto (Fig. 14 A-B), mesmo após 3 passagens cegas. A positividade de isolamento foi observada em terceira passagem para grande maioria das amostras consideradas positivas. A quantidade de amostras positivas foi maior para as amostras de ostras, sendo 21 (19.5%), e 2 (1.8%) de amostras de água do mar (Tabela 4).

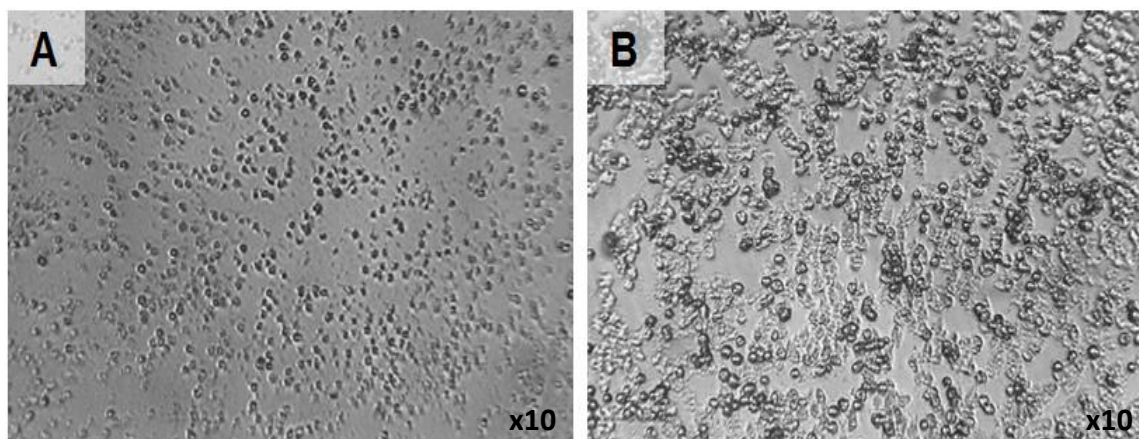


Figura 14: Imagem obtida por microscopia ótica de monocamada de *A. castellanii* inoculada com os espécimes testados. (A) monocamada de ameba 4 dias após a inoculação de uma amostra positiva. Como pode ser observado, as células de amebas apresentam-se completamente lisadas e fragmentadas. (B) monocamada após 4 dias da inoculação de uma amostra negativa.

Tabela 4: Detecção de mimivírus em amostras de ostras e água do mar, coletadas nos estados brasileiros de Santa Catarina, Bahia e Rio Grande do Norte.

Estado e Amostras	Isolamento em <i>Acanthamoeba</i>		
	Nº. total de amostras	No. (%) amostras negativas	No. (%) amostras positivas
Santa Catarina			
Água do mar	10	10 (100.0)	0 (0.0)
Ostra	18	12 (66.7)	6 (33.3)
Bahia			
Água do mar	20	18 (90.0)	2 (10.0)
Ostra	20	13 (65.0)	7 (35.0)
R. Grande do Norte			
Água do mar	20	20 (100.0)	0 (0.0)
Ostra	20	12 (60.0)	8 (40.0)
Total			
Água do mar	50	48 (96.0)	2 (4.0)
Ostra	58	37 (63.8)	21 (36.2)

Dos 23 vírus isolados, quatro foram selecionados para prosseguir com as caracterizações biológicas e moleculares. Para a seleção dos isolados foi observado os locais de isolamento e o espécime a partir do qual os novos vírus foram isolados. Sendo uma amostra proveniente de carne de ostra e uma amostra obtida a partir da água retida na concha, isolados de amostras de Santa Catarina (CO1 e SC6, respectivamente); uma amostra de água retida na concha isolado de amostras do Rio Grande do Norte (RN30); e uma amostra de água do mar isolado de amostras da Bahia (BA1).

5.1.2. Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Das 108 amostras analisadas na reação da cadeia da polimerase, 28 (25,9 %) foram positivas para o gene RNA helicase. Sendo 2 (7,2%) amostras de água do mar positivas, e 26 (92,8%) amostras de ostras positivas (Tabela 5).

Tabela 5: Detecção de mimivírus por qPCR, em amostras de ostras e água do mar, coletadas nos estados brasileiros de Santa Catarina, Bahia e Rio Grande do Norte.

Estado e Amostras	qPCR, gene helicase		
	Nº. total de amostras	No. (%) amostras negativas	No. (%) amostras positivas
Santa Catarina			
Água do mar	10	10 (100.0)	0 (0.0)
Ostra	18	7 (38,9)	11 (61,1)
Bahia			
Água do mar	20	18 (90.0)	2 (10.0)
Ostra	20	13 (65.0)	7 (35.0)
R. Grande do Norte			
Água do mar	20	20 (100.0)	0 (0.0)
Ostra	20	12 (60.0)	8 (40.0)
Total			
Água do mar	50	48 (96.0)	2 (4.0)
Ostra	58	32 (55,2)	26 (44,8)

Detectamos também, 70,8% de positividade para DNA de *Acanthamoeba* nas amostras que foram positivas para o gene RNA helicase. Para este teste, utilizamos iniciadores específicos para o gene 18S rDNA de *Acanthamoeba*.

5.2. Caracterização biológica

Para avaliar possíveis diferenças biológicas ou estruturais dentre os 4 vírus gigantes selecionados (SC6, CO1, BA1 e RN30), foram realizados testes para a caracterização biológica.

5.2.1. Teste de resistência a temperatura e a luz ultra-violeta (UV)

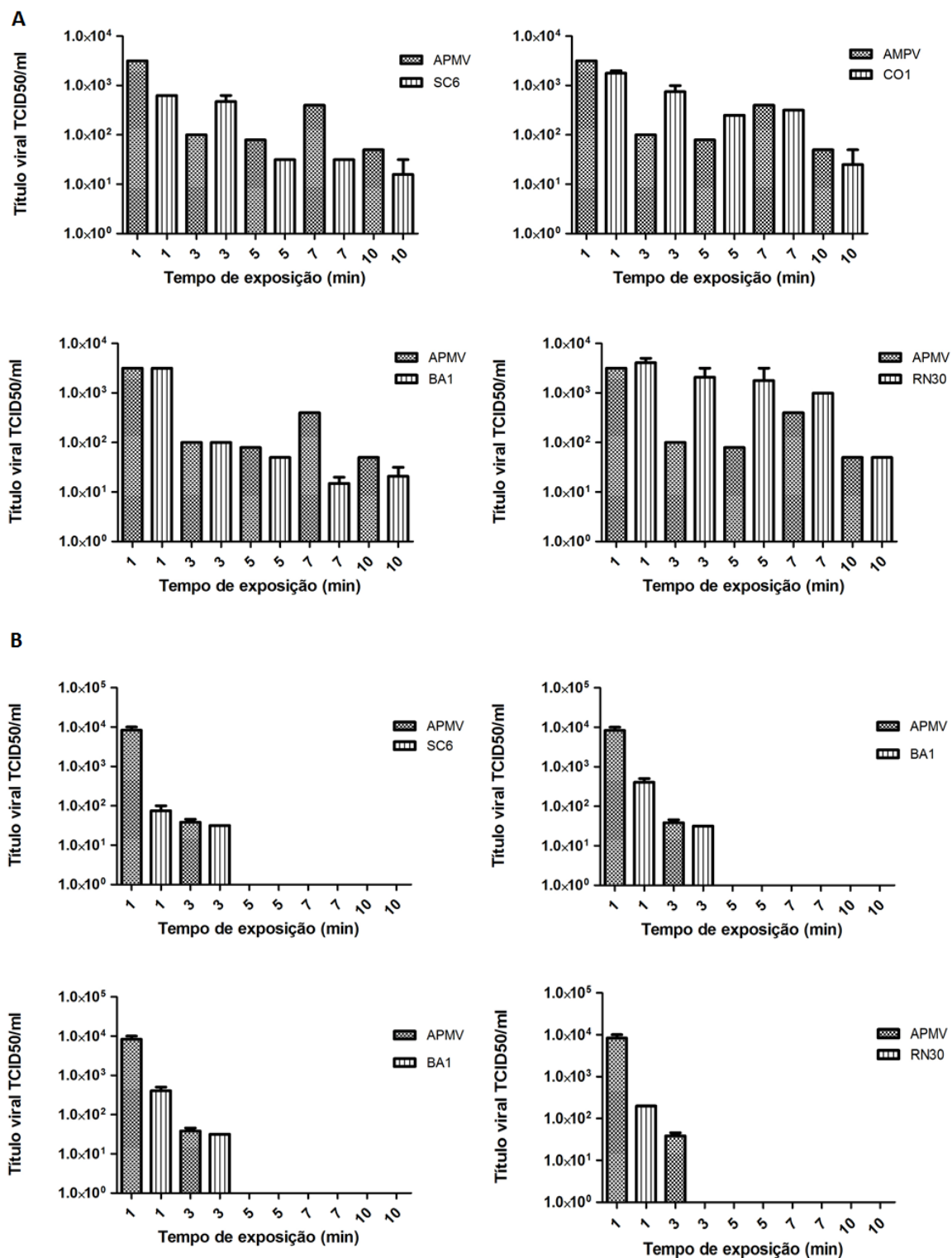
Os testes de resistência foram realizados para avaliar o perfil de sensibilidade de cada isolado frente à exposição à temperatura e a luz UV, respectivamente, em diferentes tempos, comparados com o protótipo APMV. Para o teste de resistência à temperatura, foram utilizadas 10^6 TCID₅₀/mL de APMV, SC6, CO1, BA1 e RN30. Os vírus foram submetidos a uma temperatura de 70°C por diferentes tempos (um, cinco, sete e dez minutos).

Para o teste de resistência à luz UV foram utilizadas placas de 6 poços contendo 1 mL de solução viral com a mesma quantidade de partículas virais de cada um dos os vírus utilizados para o teste de resistência à temperatura. Essas placas foram expostas à luz UV por diferentes tempos (um, cinco, sete e dez minutos).

Os experimentos de resistência foram feitos em duplicatas. Após os tempos de exposição à temperatura e à luz UV, cada inóculo foi coletado e processado para realização da titulação viral em monocamada de amebas, o título viral foi obtido conforme descrito no item 4.2.7.

Após a exposição à temperatura, o isolado SC6 apresentou um redução do título em quase 1 log nos tempos 1, 5, 7 e 10 min, e quando comparado com o APMV, somente no tempo 3 min apresentou um aumento de quase 1 log em seu título. Para o isolado CO1, nos tempos 3 e 5 min seu título foi maior que o do APMV quase 1 log em cada tempo. Nos tempos 1, 7 e 10 min a redução do título foi semelhante ao do APMV. Para o isolado BA1, nos tempos 1, 3, 5 e 10 min não houve diferenças significativas na redução de seu título comparado com o APMV, já no tempo 7 min foi observada uma redução de quase 2 log em seu título comparado com o APMV. Para o isolado RN30, nos tempos 1, 7 e 10 min a redução de seu título foi semelhante a do APMV, enquanto nos tempos 3 e 5 seu título foi de quase 2 log a mais do que o do APMV (Fig. 15 A).

Após a exposição à luz UV, o isolado SC6 no tempo 1 min apresentou uma redução de 2 log em seu título comparado com o APMV, enquanto no tempo 3 min essa redução foi semelhante, e nos tempos 5, 7 e 10 min não foi possível detectar partícula viral viável nem no isolado SC6 nem no APMV. Para o isolado CO1, seu título foi menor que o do APMV somente no tempo 1 min, pois no tempo 3 min seu título foi de quase 1 log a mais que o do APMV, nos tempos 5 e 7 só foi possível calcular o título para o isolado CO1, pois o APMV havia sido inativado, enquanto no tempo 10 min os dois vírus foram inativados. Para o isolado BA1, no tempo 1 min o título do APMV foi quase 2 log maior, enquanto no tempo 3 os títulos foram semelhantes, já nos tempos 5, 7 e 10 min os dois vírus foram inativados. Para o isolado RN30, no tempo 1 min seu título foi quase 2 log menor que o do APMV, já no tempo 3 só foi possível calcular o título do APMV, pois o RN30 já havia sido inativado, e o APMV só foi inativado nos tempos seguintes (5, 7 e 10 min) (Fig. 15 B).



5.2.2. Perfil proteico

Para avaliar o perfil proteico total das partículas virais dos novos isolados, foi realizado um ensaio de eletroforese em PAGE, no qual foi observada uma similaridade entre o perfil de bandas das proteínas totais da partícula viral de cada isolado e o protótipo APMV (Fig 16).

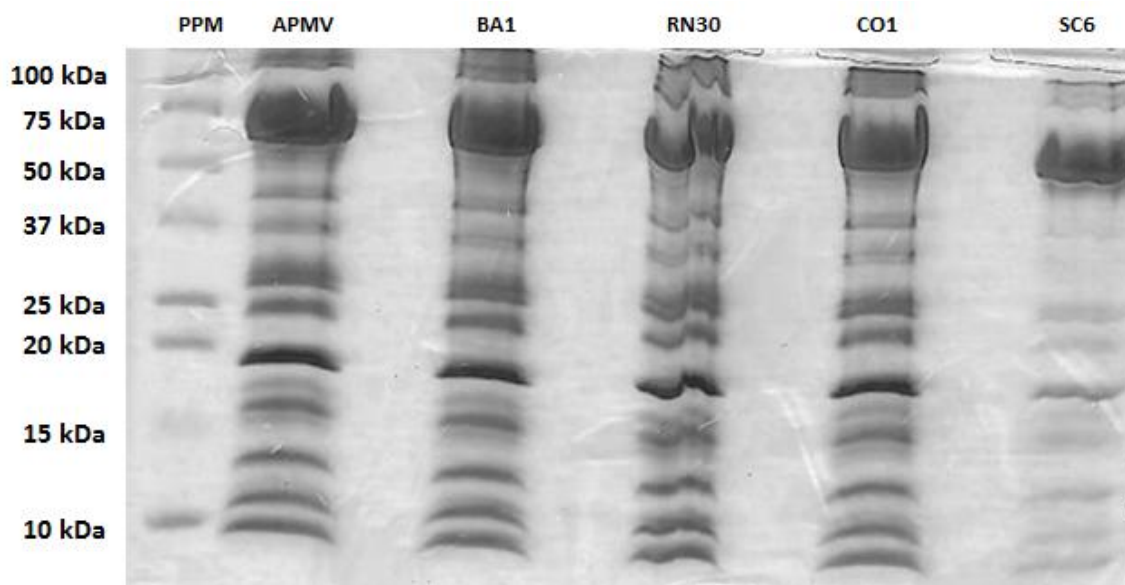


Figura 16: Comparação entre o perfil proteico total dos isolados BA1, RN30, CO1, SC6 e o protótipo APMV, através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). É observado um perfil proteico total semelhante entre o protótipo APMV e os novos isolados brasileiros de mimivírus.

5.2.3. Curva de ciclo único

O ensaio de curva de ciclo único foi desenvolvido para avaliar o perfil de crescimento dos novos vírus isolados comparando com o protótipo APMV (Fig. 17). Para isso, placas de 24 poços contendo aproximadamente 2×10^5 amebas apresentando uma confluência de cerca 80% foram infectadas com o cada vírus gigante isolado em uma M.O.I. de 10. Foram realizadas coletas em diferentes tempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) e em seguida a suspensão coletada foi titulada seguindo o protocolo descrito no item 4.2.7.

Foi observado que os novos isolados apresentam um perfil de crescimento diferente entre si, e principalmente quando comparados com o APMV. Para o isolado SC6 seu pico máximo de multiplicação é de 6 horas de infecção, apresentando um título viral de 10^8 TCID₅₀/mL. Enquanto para os

isolados CO1, BA1 e o APMV esse pico é de 8 horas de infecção, apresentando títulos virais de 10^7 , 10^5 e 10^7 TCID₅₀/mL, respectivamente. Já para o isolado RN30, esse pico é de 12 horas de infecção, apresentando um título viral de 10^6 TCID₅₀/mL. Isso sugere que os novos isolados apresentam alguma alteração biológica que possa interferir em seu ciclo de multiplicação.

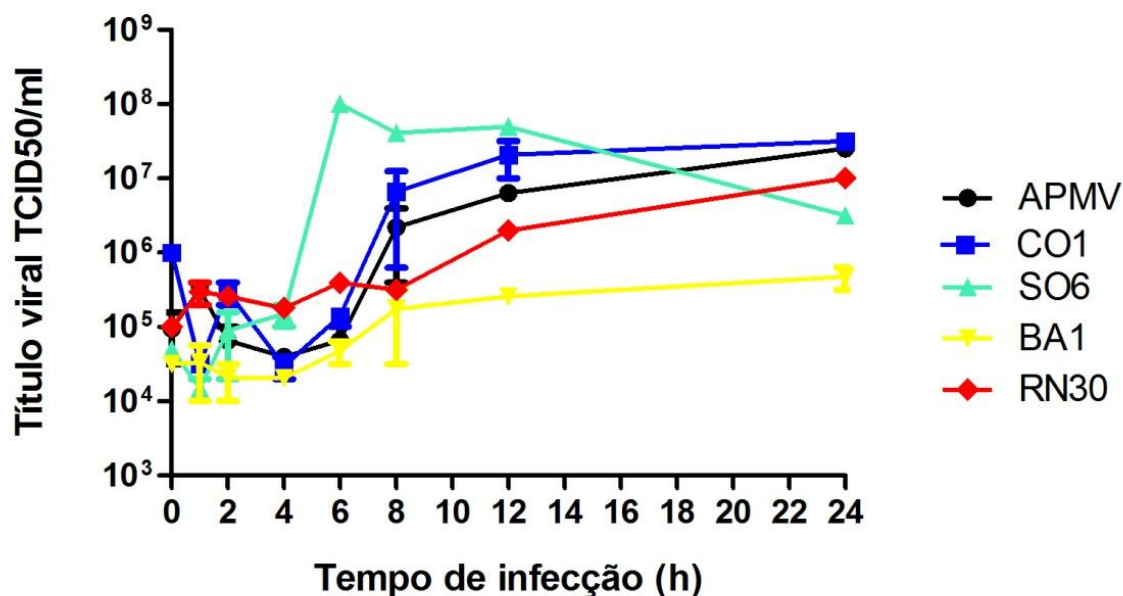


Figura 17: Ensaio de curva de ciclo único para os novos isolados comparados ao APMV em amebas *A. castellanii*. Culturas de *A. castellanii* foram infectadas com M.O.I. de 10. O título viral pelo método TCID₅₀ foi determinado em diferentes tempos após a infecção pelo SC6, CO1, BA1, RN30 e do protótipo APMV.

5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As características morfológicas dos novos vírus isolados foram observadas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Para a sua realização, monocamadas de amebas da espécie *A. castellanii* foram infectadas na M.O.I. de 0,01 com SC6, CO1, BA1 e RN30. Como controle foi utilizada monocamada de amebas não infectadas. Após 36 horas de infecção, a monocamada de amebas foi coletada, processada e encaminhada ao Centro de Microscopia da UFMG, onde foram preparadas as seções ultrafinas e observadas em microscópio eletrônico de transmissão.

As imagens dos novos isolados revelaram a presença de partículas semelhantes ao APMV com simetria quase-icosaédrica, apresentando um tamanho de 500-700nm dentro do citoplasma das amebas infectadas. Em algumas imagens foi possível observar na face pentagonal uma estrutura 'stargate' típica e longas fibras superficiais. Foi possível observar também a presença de partículas em etapas distintas da morfogênese viral, a qual ocorria dentro de fábricas virais ($>2\mu\text{M}$) no citoplasma das amebas (Fig. 18 A-E).

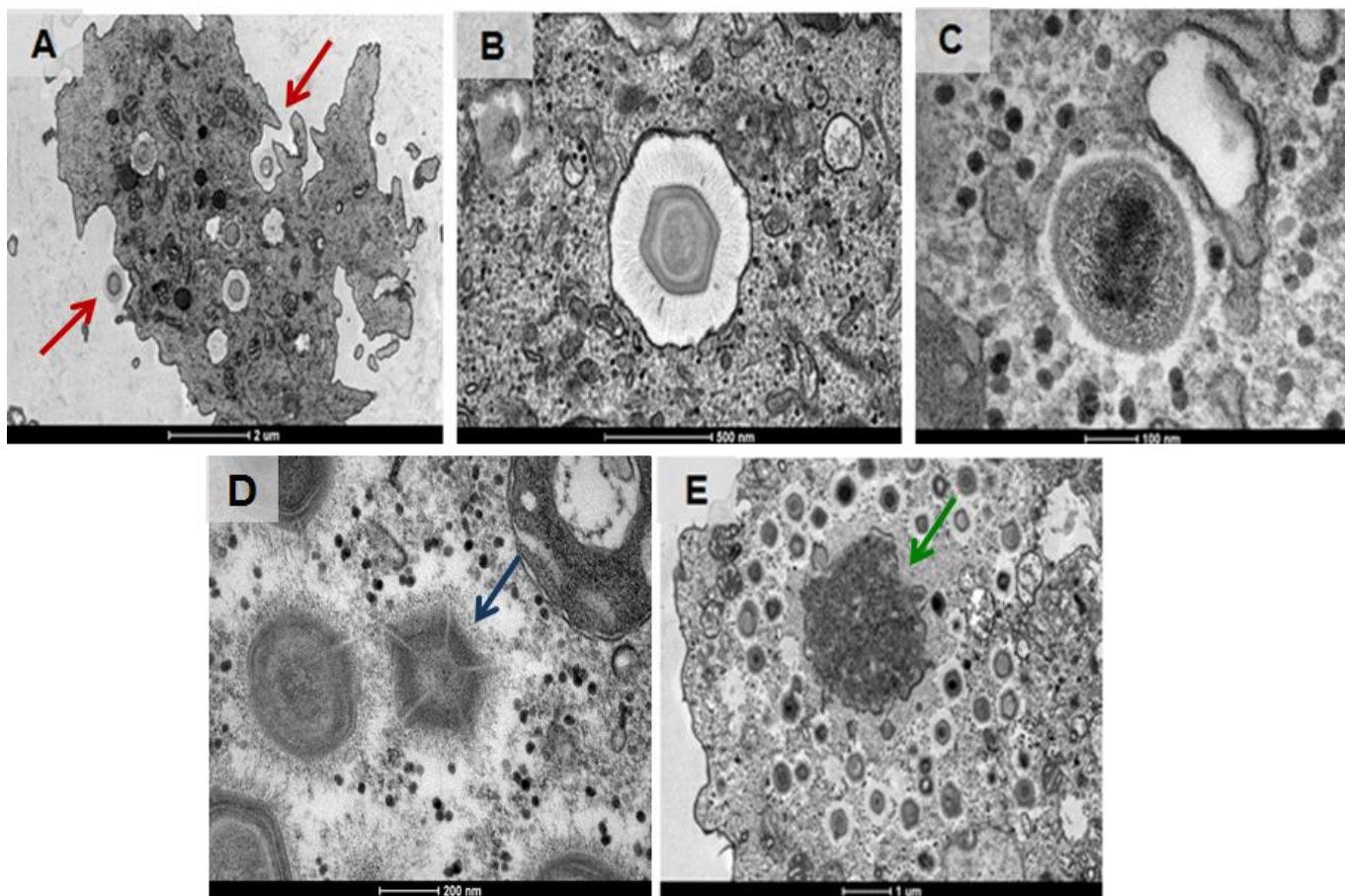


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão de alguns dos novos mimivírus brasileiros isolados, destacando diferentes etapas da morfogênese viral. (A) Partículas de mimivírus penetrando em uma célula de *A. castellanii* por fagocitose (setas vermelhas). (B) Partícula viral dentro de um fagossomo. (C) Semente viral. (D) Estrutura 'stargate' típica indicada pela seta azul. (E) Fábrica viral indicada pela seta verde.

Foi observado também na amostra do isolado SC6, partículas com alterações na morfologia, apresentando partículas com o capsídeo aberto e partículas com um acúmulo de proteínas ao redor do capsídeo (Fig. 19).

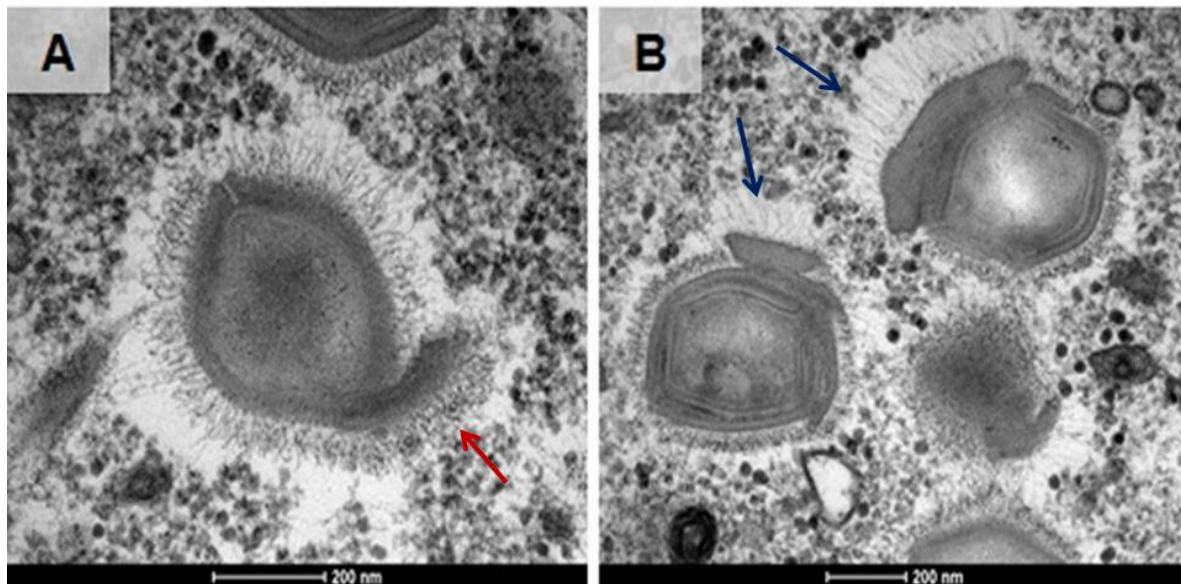


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão dos novos vírus isolados demonstrando a presença de partículas defeitivas. É observada uma partícula viral com a morfologia alterada apresentando, (A) um capsídeo aberto (seta vermelha) e (B) acúmulos de proteínas ao redor do capsídeo (seta azul).

5.3. Caracterização molecular

Para avançar na caracterização dos novos isolados, técnicas moleculares foram empregadas.

5.3.1. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento do gene RNA helicase

O DNA obtido na qPCR do item 5.1.2, a partir de 28 (25.9%) amostras positivas, foi sequenciado em ambas as orientações. As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com sequências do gene RNA helicase de mimivírus disponíveis no GenBank e revelaram uma alta similaridade (98.2 - 100%) entre os nossos isolados e os mimivírus do grupo A pertencentes à família *Mimiviridae*, incluindo APMV, mamavirus, sambavirus e outros. Entretanto, as amostras SC1, SC2, SC3, SC5, SC7, RN27, RN30, RN33 e BA29 apresentaram sítios polimórficos no gene RNA helicase (Fig. 20 A).

Árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método Neighbor-Joining, e foi possível verificar uma relação próxima entre os nossos novos isolados e os vírus da família *Mimiviridae*, especialmente os vírus pertencentes ao grupo A (Fig. 20 B).

A

	TCC	ACA	TCC	CAT	AAC	TAA	AAC	TCC	ACG	ACC	TCC	TTC	TTC	CAT	ACC	TTT	TAT	AAT	TTT	ATC	AGA	AAC	CAT	TTG	TIG	A	
OY_SC7	TCC	ACA	TCC	CAT	AAC	TAA	AAC	TCC	ACG	ACC	TCC	TTC	TTC	CAT	ACC	TTT	TAT	AAT	TTT	ATC	AGA	AAC	CAT	TTG	TIG	A	
OY_SC1	C	G	
OY_SC2	G	...	C	
OY_SC3	C	T	
OY_SC5	C	T	
OY_SC6	C	
OY_SC9	C	
OY_RN27	C	T	
OY_RN40	C	
OY_RN33	C	T	
OY_RN30	G	C	
OY_RN29	C	
OY_RN35	C	
OY_BA29	...	A	C	
OY_BA28	C	
OW_BA1	C	
OY_BA23	C	
APMV	C	
Samba_virus	C	
Mimivirus_Terra2	C	C	
Hirudovirus	C	
Mamavirus	C	C	
Mimivirus_Terra1	A.G	T	...	T.T	A	...	C	...	ATG	...	AG	A.A	T	...	A.C	C	...	TAC	...	AC	C
Megavirus_LBA	A.G	T	...	T.T	A	...	C	...	ATG	...	AG	A.A	T	...	A.C	C	...	TAC	...	AC	C
Megavirus_chiliensis	A.G	T	...	T.T	A	...	C	...	ATG	...	AG	A.A	T	...	A.C	C	...	TAC	...	AC	C
Courdoll	A.G	T	...	T.T	A	...	C	...	ATG	...	AG	A.A	T	...	A.C	C	...	TAC	...	AC	C
Moumouvirus	-	...	A	...	T.A	...	A	...	T.C	...	ATGG	A.A	T	...	A.C	T	...	TAC	...	TC	...
Moumouvirus_Monve	-	...	A	...	T.A	...	A	...	T.C	...	ATGG	A.A	T	...	A.C	T	...	TAC	...	TC	...

B

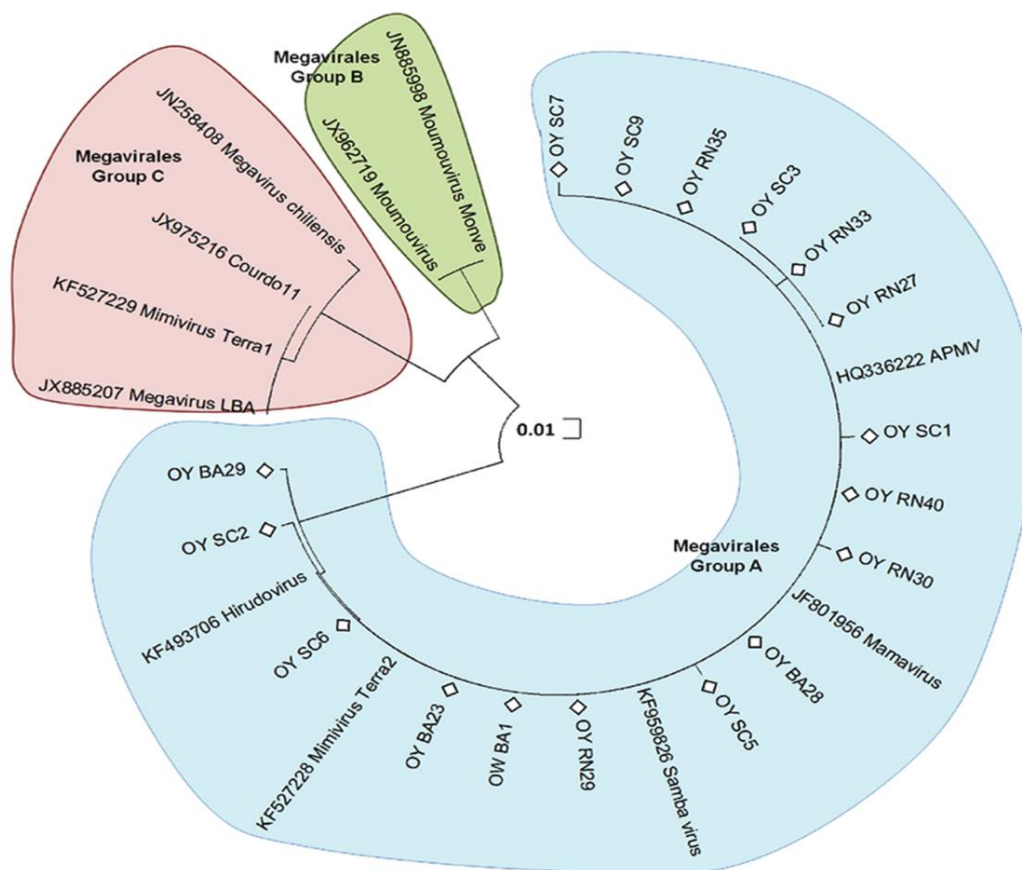


Figura 20: Análises filogenéticas baseadas no gene RNA helicase. (A) Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de um fragmento do gene helicase dos vírus gigantes núcleo-citoplasmático de DNA. As amostras obtidas neste estudo estão em negrito; nucleotídeos em vermelho indicam sítios de polimorfismo entre os isolados obtidos neste estudo. (B) Árvore filogenética construída usando as seqüências dos amplicons obtidas a partir do gene da helicase. OW= amostras de água do mar / OY= amostras de ostra e água de ostra.

6. DISCUSSÃO

Sabe-se que os vírus são as 'formas de vida' mais abundantes nos oceanos e são reservatórios da maior parte da diversidade genética do mar, embora somente na última década estimativas quantitativas revelaram que cada mililitro de água contém milhões dessas partículas (SUTTLE, 2007). Neste contexto, o presente trabalho corrobora com tais estudos prévios, ao isolar novos vírus gigantes de DNA a partir de amostras oriundas dos oceanos.

Os vírus gigantes permaneceram por muito tempo indetectáveis. O isolamento desses vírus possui limitações técnicas e os protocolos clássicos baseados em filtração adiaram sua detecção. Outro problema é a sua gama limitada de hospedeiros conhecidos, o que restringe o uso dos sistemas celulares para a cultura *in vitro* (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010). A maioria dos estudos de prospecção de vírus gigantes dependem de co-culturas diretas de amostras com amebas para propagar o vírus. No entanto, o enriquecimento de amostras do meio ambiente pode ser útil para o isolamento do vírus, tal como demonstrado pela descoberta do *Megavirus chilienses* (ARSLAN *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi realizado um enriquecimento das amostras e após o isolamento foi observada uma diferença significativa entre a detecção de mimivírus a partir de amostras de ostras e de água do mar (Tabela 4), independentemente da região em que as coletas foram realizadas. Das 58 amostras de ostra, 36.2% (21) foram positivas no ensaio de isolamento viral; enquanto das 50 amostras de água do mar, 2 (4.0%) foram positivas. Comparando qPCR e isolamento, foi possível observar uma maior positividade no primeiro método, sendo 2 (7,2%) amostras de água do mar positivas, e 26 (92,8%) amostras de ostras positivas, um resultado esperado devido à sua maior sensibilidade. Estes resultados contrastam com resultados obtidos em outros estudos (PAGNIER *et al.*, 2013). Além disso, outros fatores, tais como a integridade das partículas virais e as diferenças entre os hospedeiros celulares naturais e as células utilizadas para o isolamento laboratorial podem explicar esta diferença.

Não há evidências de que mimivírus se propagem e reproduzam em ostras. Detectamos 70,8% de positividade para DNA de *Acanthamoeba* nas

amostras analisadas, que foram também positivas para o gene RNA helicase. Corroborando que amebas do gênero *Acanthamoeba* são seus reservatórios conhecidos.

Submetendo os novos isolados à exposição à temperatura de 70°C, foi observada redução do título viral em cada isolado à medida que o tempo de exposição aumentava. Quando submetidos à exposição à luz UV, foi possível observar que o isolado RN30 foi inativado com 3 minutos de exposição, os isolados SC6 e BA1 foram inativados com 5 minutos de exposição e o isolado CO1 foi inativado com 10 minutos de exposição; sugerindo então, que o isolado CO1 é mais resistente à exposição à luz UV que os outros isolados, e que o isolado RN30 é mais sensível, enquanto os isolados SC6 e BA1 apresentam uma resistência intermediária à exposição à luz UV. Quando expomos os isolados à luz UV, é observado que a redução do título viral é mais significativa do que quando comparado aos testes de resistência à temperatura (Fig. 15 A-B). O que corrobora aos resultados obtidos em outros estudos, que observaram que os vírus são significativamente afetados pelo tratamento com luz UV, com exceção dos adenovírus que são mais resistentes (HIJNEM *et al.*, 2006). Além disso, as diferenças na sensibilidade a exposição à temperatura e a luz UV observadas, podem indicar diferenças biológicas e/ou estruturais dos novos isolados, diferenças essas que podem influenciar no ciclo de vida e no nicho/habitat de cada isolado.

Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida foram utilizados na caracterização de outros vírus gigantes, como Marseillevirus (BOYER *et al.*, 2009), Moumouvirus (YOOSUF *et al.*, 2012), Pandoravirus (PHILIPPE *et al.*, 2013), Pithovirus (LEGENDRE *et al.*, 2014). Neste ensaio observamos uma similaridade entre o perfil proteico total da partícula viral do APMV e de alguns dos nossos isolados (Fig. 16). Embora tenha sido possível observar diferenças nos perfis de crescimento dos novos isolados através das curvas de ciclo único (Fig. 17), sugerindo que os novos isolados apresentam alguma alteração biológica que interfira em seu ciclo de multiplicação.

Utilizando microscopia eletrônica de transmissão foram observadas partículas apresentando características semelhantes a outros vírus pertencentes à família *Mimiviridae*. As partículas apresentam um tamanho entre 500-700nm de diâmetro, fábricas virais típicas foram observadas, além de

algumas etapas da morfogênese viral. Esses achados corroboram ao que foi observado em outros estudos (LA SCOLA *et al.*, 2003, MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; XIAO *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2014). Foi observada também a presença de partículas com alterações na sua conformação, esse fenômeno é característico da presença de virófagos, que também foi observado em outros estudo de vírus gigantes (LA SCOLA *et al.*, 2008). Os virófagos durante o ciclo de replicativo do vírus gigante podem interferir na transcrição de proteínas estruturais, incluindo proteínas relacionadas com a morfogênese viral, entre outras. Isso ocorre porque as regiões promotoras do genoma do virófago tem mais afinidade pela RNA polimerase do vírus gigante, assim a formação de partículas virais viáveis é alterada (Fig. 19). Todavia, não foi possível detectar por PCR em tempo real o gene do capsídeo do virófago Sputnik, provavelmente os iniciadores utilizados não eram específicos.

As sequências nucleotídicas obtidas dos novos isolados foram alinhadas a sequências do gene RNA helicase de mimivírus contidas em bases de dados e revelaram uma alta similaridade com os vírus do grupo A pertencentes à família *Mimiviridae*, incluindo APMV, mamavírus, sambavírus e outros (98.2 - 100%). Obtivemos uma maior detecção de vírus pertencentes ao grupo A, isso provavelmente pode ter ocorrido devido a maior especificidade dos iniciadores utilizados, embora eles detectem vírus dos três grupos (A, B e C). Estes resultados são condizentes com resultados obtidos em outros estudos (GAIA *et al.*, 2013).

O sucesso de isolamento de mimivírus em amostras de ostras foi maior do que em água do mar, provavelmente pelo fato das ostras serem organismos filtradores e por possuírem a capacidade de acumular em seu interior tanto componentes químicos quanto microrganismos presentes nas águas ao seu redor. E por isso, provavelmente a presença de amebas é maior nas ostras do que na água do mar. Corroborando assim a hipótese de que a capacidade da APMV para infectar amebas pode ser um mecanismo para aumentar a resistência ambiental do vírus, e é provável que APMV tenha adquirido a capacidade de usar amebas como bunkers mesmo antes de seu ambiente ser ocupado por seres humanos (BORATTO *et al.*, 2013).

7. CONCLUSÕES

- Novos vírus gigantes foram isolados a partir de amostras de ostra, água interna da concha e água do mar;
- Na MET foram observadas partículas virais semelhantes aos vírus pertencentes à família *Mimiviridae*, fábricas virais típicas e diferentes etapas da morfogênese viral;
- Partículas defectivas foram visualizadas na microscopia eletrônica de transmissão, sugerindo a presença de virófagos;
- Os novos isolados apresentam possíveis diferenças biológicas e/ou estruturais observadas a partir dos ensaios de resistência em que foram expostos à temperatura e luz UV;
- Os novos isolados possuem um perfil proteico semelhante ao APMV;
- Os novos isolados pertencem ao grupo A da família *Mimiviridae*;
- Nossos resultados sugerem que as ostras são uma excelente fonte para o isolamento de vírus gigantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, J. S.; DORNAS, F. P.; SILVA, L.C.F.; ALMEIDA, G.M.; BORATTO, P. V.; COLSON, P.; LA SCOLA, B.; KROON, E.G. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. **Virology Journal**. v. 11:120, 2014.

AKSOZEK, A.; McCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. **J. Parasitol.** v. 88, p. 621 – 623, 2002.

AHERFI, S.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; COLSON, P. Complete genome sequence of Cannes 8 virus, a new member of the proposed family “*Marseilleviridae*”. **Virus Genes**. v. 47, p. 550–555, 2013.

AHERFI, S.; BOUGHALMI, M.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; COLSON, P. Complete genome sequence of Tunisvirus, a new member of the proposed family *Marseilleviridae*. **Arch Virol.** v. 159, p. 2349–2358, 2014.

AQEEL, Y.; SIDDIQUI, R.; IFTIKHAR, H.; KHAN, N.A. The effect of different environmental conditions on the encystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. **Experimental Parasitology**.v. 135, p. 30–35, 2013.

ANDRADE, K.R; BORATTO, P.P.V.M.; RODRIGUES, F.P.; SILVA, L.C.F.; DORNAS, F.P.; PILOTTO, M.R.; LA SCOLA, B.; ALMEIDA, G.M.F.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. **Arch Virology**. v. 160, p. 477-482, 2015.

ARSLAN, D., Legendre, M.; Seltzer, V.; Abergel, C.; Claverie, J.M. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of *Megaviridae*. **Proc Natl Acad Sci.** v. 108, n. 42, p. 17486-17491, 2011.

BERGER, P.; PAPAIZIAN, L.; DRANCOURT, M.; LA SCOLA, B.; AUFRAY, J.P.; RAOULT, D. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. **Emerg Infect Dis.** v. 12, p. 248-55, 2006.

BORATTO, P.V.M., DORNAS, F.P.; ANDRADE, K.R.; RODRIGUES, R.; PEIXOTO, F.; SILVA, L.C.F.; LA SCOLA, B.; COSTA, A.O.; de ALMEIDA, G.M.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. Amoebas as mimivirus bunkers: increased resistance to UV light, heat and chemical biocides when viruses are carried by amoeba hosts. **Arch Virol.** v. 159, p. 1039-1043, 2014.

BOYER, M., MADOU, M.A.; GIMENEZ, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Phylogenetic and Phyletic Studies of Informational Genes in Genomes Highlight Existence of a 4th Domain of Life Including Giant Viruses. **PlosOne.** v. 5, n. 12, p. 1-8, 2010.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. Filo *Mollusca*. In: **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2ª ed., cap. 20, p. 731-804, 2011.

CAMPOS, R.K.; BORATTO, P.V.; ASSIS, F.L.; AGUIAR, E.R.; ALBARNAZ, J.D.; DORNAS, F. P.; TRINDADE, G. S.; FERREIRA, P. P., MARQUES, J. T.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J. S. *Samba virus*: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. **Virology Journal.** v. 11, p. 95-106, 2014.

CASTRILLÓN, J.C.; OROZCO, L.P. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Rev Chilena Infectol.**v. 30, n. 2,p. 147-155, 2013.

CLAVERIE, J.M.; OGATA, H.; AUDIC, S.; ABERGEL, C.; SUHRE, K.; FOURNIER, P.E. Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus. **Virus Res.** v. 117, n. 1, p. 133-144, 2006.

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

CLAVERIE, J.M. Giant virus in the sea: Extending the realm of Megaviridae to Viridiplantae. **Communicative & Integrative Biology.** v. 6, p. e25685-1- 4, 2013.

COLSON, P.; GIMENEZ, G.; BOYER, M.I.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. The giant Cafeteria roenbergensis virus that infects a widespread marine phagocytic protist is a new member of the fourth domain of Life. **PLoS One.** v. 6, n. 4, p. 01-11, e18935, 2011a.

COLSON, P. YUTIN, N.; SHABALINA, S.A.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Viruses with more than 1,000 Genes: *Mamavirus*, a new *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* strain, and reannotation of mimivirus genes. **Genome biology and evolution.** v. 3, p. 737–742, 2011b.

COLSON, P.; de LAMBALLERIE, X.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order *Megavirales*. **Intervirology.** v. 55, p.321–332, 2012.

COLSON, P.; PAGNIER, I.; YOOSUF, N.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. "Marseilleviridae", a new family of giant viruses infecting amoebae. *Arch. Virol.* v. 158, n. 4, p. 915-920, 2013a.

COLSON, P. et al. Evidence of the megavirome in humans. **Journal of Clinical Virology**. v. 57, p. 191-200, 2013b.

COLSON, P.; FOURNOUS, G.; DIENE, S.M.; RAOULT, D. Codon usage, amino acid usage, transfer RNA and amino-acyl-tRNA Synthetases in mimiviruses. **Intervirology**, Suíça, v. 56, n. 6, p.364-75, 2013c.

DARE, R.K.; CHITTAGANPITCH, M.; ERDMAN, D.D. Screening pneumonia patients for mimivirus. **Emerg Infect Dis.**, v. 14, p. 465-467, 2008.

DESNUES, C.; RAOULT, D. Inside the lifestyle of the virophage. **Intervirology**, v. 53, n.5, p. 293-303, 2010.

DESNUES, C. *et al.* Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. **PNAS**. v. 109, n. 44, p. 18078-18083, 2012.

DIEGO, A.G.L.; RAMOS, A.P.D.; SOUZA, D.S.M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J.A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R.C.; MICOLI, A.A.; NETO, R.C.; BARARDI, C.R.M.; FRANCO, R.M.B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**. v. 72, p. 93-100, 2013.

DORNAS, F.P.; RODRIGUES, F.P.; BORATTO, P.V.M.; SILVA, L.C.F.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; TRINDADE, G.S.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J.S. *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* Stability in Environmental and Clinical Substrates: Implications for Virus Detection and Isolation. **PLoS One**. v. 9, p. 1-7, 2014b.

EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia. Electropherogram quality analysis. Brasil, 2010. Disponível em <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em 10 maio 2013.

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

ETTEN, J.L.V. Another Really, Really Big Virus. **Viruses**.v.3, p. 32-46, 2011.

FILÉE, J. Lateral gene transfer, lineage-specific gene expansion and the evolution of Nucleo Cytoplasmic Large DNA viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 101, p. 169–171, 2009.

FISCHER, M.G.; SUTTLE, C.A. A Virophage at the Origin of Large DNA Transposons. **SCIENCE**. v. 332, p. 231-234, 2011.

FORTERRE, P. Giant Viruses: Conflicts in Revisiting the Virus Concept. **Intervirology**. v. 53, p. 362–378, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics (PDF) 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3740t.pdf>> Acesso em: 20 de junho de 2013.

GAIA, M.; PAGNIER, I.; CAMPOCASSO, A.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. LA SCOLA, B. Broad Spectrum of Mimiviridae Virophage Allows Its Isolation Using a Mimivirus Reporter. **PLOS ONE**. v. 8, e61912, 2014.

GHEDIN, E.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus relatives in the Sargasso Sea. **Virolog. J.** p. 62, 2005.

GHIGO, E.; KARTENBECK, J.; LIEN, P.; PELKMANS, L.; CAPO, C.; MEGE, J.L.; RAOULT, D. Ameobal Pathogen Mimivirus Infects Macrophages through Phagocytosis. **PLoS Pathogens**. v. 4, n. 6, p. 01-17, 2008.

GUIGUET LEAL, D.A.; FRANCO, R.M.B. Bivalve molluscs destined for human consumption as vectors of pathogenic protozoa: detection methodologies and control rules. **Rev. Panam. Infectol.** v. 10, p. 48-57, 2008.

HACKER, J.; OTT, M.; WINTERMEYER, E.; LUDWIG, B.; FISCHER G. Analysis of virulence factors of Legionella pneumophila. **Zentralbl Bakteriologie**. v. 278, p. 348-58, 1993.

HASSAN, A.; FAROUK, H.; HASSANEIM, F.; ABDUL-GHANI, R.; ABDELHADY, A.H. *Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: a neglected potential source of infection. **J Infect Public Health**. v. 5, n. 4, p. 304-310, 2012.

HIJNEN, W.A.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Water Res** 40, p. 3–22, 2006.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Acesso em 20 de setembro de 2014.

IYER, L.M.; BALAJI, S.; KOONIM, E.V.; ARAVIND, L. Evolutionary genomics of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses. **Virus Res.** v. 117, p. 156–184, 2006.

KRUPOVIC, M.; CVIRKAITE-KRUPOVIC, V. Towards a more comprehensive classification of satellite viruses. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 10, p. 234, 2012.

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

KHAN, M.; LA SCOLA, B.; LEPIDI, H; RAOULT, D. Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. **Microbial Pathogenesis.** v. 42, p. 56–61, 2006.

KHAN, N.B.; AHMED, I.; MALIK, A.; SHEIKH, L. Factors associated with failed induction of labour in a secondary care hospital. **JPMA, The Journal of the Pakistan Medical Association.** v. 62, n. 1,p. 6-10, 2012.

KUZNETSOV, Y.G.; KLOSE, T.; ROSSMANN, M.; MCPHERSON, A. Morphogenesis of mimivirus and its viral factories: an atomic force microscopy study of infected cells. **Journal of virology**, E.U.A., v. 87, n. 20, p. 11200-11213, 2013.

LARCHER, C.; JELLER, V.; FISCHER, H.; HUEMER, H.P. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalised children in Austria. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 25, p. 681-686, 2006.

LASJERDI, Z.; NIYYATI, M.; HAGHIGHI, A.; SHAHABI, S.; BIDEROUNI, F.T.; TAGHIPOUR, N.; EFTEKHAR, M.; MOJARAD, E.N. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran., **Parasitol Res.** v. 109, n. 3, p. 575-580, 2011.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**.v. 299, p. 2033, 2003.

LA SCOLA, B.; MARRIE, T.J.; AUFRAY, J.P.; RAOULT, D. Mimivirus in pneumonia patients. **Emerg Infect Dis.** v. 11, p. 449–452, 2005.

LA SCOLA, B.; DESNUES, C.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; BARRASSI, L.; FOURNOUS, G.; MERCHAT, M.; SUZAN-MONTI, M.; FORTERRE, P.; KOONIN, E.; RAOULT, D. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. **Nature**.v. 455, p. 100-104, 2008.

LA SCOLA, B.; CAMPOCASSO, A.; N'DONG, R.; FOURNOUS, G.; BARRASSI, L.; FLAUDROPS, C.; RAOULT, D. Tentative Characterization of New Environmental Giant Viruses by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Intervirology**. v. 53, p. 344–353, 2010.

LEGENDRE, M.; AUDIC, S.; POIROT, O.; HINGAMP, P.; SELTZER, V.; BYRNE, D.; LARTIGUE, A.; LESCOT, M.; BERNADAC, A.; POULAIN, J.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Research**. v. 20, p. 664–674, 2010.

LEGENDRE, M.; BARTOLI, J.; SHMAKOVA, L.; JEUDY, S.; LABADIE, K.; ADRAIT, A.; LESCOT, M.; POIROT, O.; BERTAUX, L.; BRULEY, C.; COUTÉ, Y.; RIVKINA, E.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. **PNAS**. v. 111, n. 11, p. 4274–4279, 2014.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.

MARTINEZ, A.J.; VISVESVARAZ, G.S. Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. **Brain Pathology**. v. 7, p. 583-598, 1997.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Trop. Med. Parasitol.** v. 46, p. 106–108, 1995.

MRAZEK, J.; KARLIN, S. Distinctive features of large complex virus genomes and proteomes. **Proc Natl Acad Sci.** v. 104, p. 5127–5132, 2007.

MOREIRA, D.; BROCHIER-ARMANET, C. Giant viruses, giant chimeras: The multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. **BMC Evolutionary Biology.** v. 8, n. 12, p. 01-10, 2008.

MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCIA, P. Ten reasons to exclude viruses from the tree of life. **Nat Rev Microbiol.** v. 7, p. 306–311, 2009.

MUTSAFI, Y.; ZAUBERMAN, N.; SABANAY, I.; MINSKY, A. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. **P Proc Natl Acad Sci.** v. 107, n. 13, p. 5978–5982, 2010.

MUTSAFI, Y.; SHIMONI, E.; SHIMON, A.; MINSKY, A. Membrane Assembly during 977 the Infection Cycle of the Giant Mimivirus. **PLoS pathogens.**v. 9, p. 1003367, 2013.

OVRUTSKY, A.R.; CHAN, E.D.; KARTALIJA, M.; BAI, X.; JACKSON, M.; GIBBS, S.; FALKINHAM III, J.O.; ISEMAN, M. D.; REYNOLDS, P.R.; MCDONELL, G.; THOMAS, V. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. **Appl Environ Microbiol.** v. 79, n. 10, p. 3185-3192, 2013.

PAGNIER, I.; RETENO, D.G.I.; SAADI, H.; BOUGHALMI, M.; GAIA, M.; SLIMANI, M.; NGOUNGA, T.; BEKLIZ, M.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA

SCOLA, B. A Decade of Improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae Isolation from Amoeba. **Intervirology**. v. 56, p. 354–363, 2013.

PHILIPPE, N.; LEGENDRE, M.; DOUTRE, G.; COUTE, Y.; POIROT, O.; LESCOT, M.; ARSLAN, D.; SELTZER, V., BERTAUX, L.; BRULEY, C.; GARIN, J.; CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes. **Science**. v. 341, p. 281-286, 2013.

POPGEORGIEV, N.; BOYER, M.; FANCELLO, L.; MONTEIL, S.; ROBERT, C.; RIVET, R.; NAPPEZ, C.; AZZA, S.; CHIARONI, J.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Giant Blood Marseillevirus recovered from asymptomatic blood donors. **Journal of Infectious Diseases**. v. 208, n. 7, p. 1042-1050, 2013a.

POPGEORGIEV, N.; MICHEL, G.; LEPIDI, H.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Marseillevirus Adenitis in an Eleven-Month-Old Child. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 12, p. 4102-4105, 2013b.

POPGEORGIEV, N.; COLSON, P.; THURET, I.; CHIARIONI, J.; GALLIAN, P.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Marseillevirus prevalence in multitransfused patients suggests blood transmission. **Journal of Clinical Virology**. v. 58, n. 4, p. 722-725, 2013c.

RAOULT, D.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; ABERGEL, C.; RENESTO, P.; OGATA, H.; LA SCOLA, B.; SUXAN, M.; CLAVERIE, J.M. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. **Science**. v. 306, p. 1344–1250, 2004.

RAOULT, D. The journey from Rickettsia to Mimivirus. **ASM News**, E.U.A., v. 71, n. 6, p. 278-84, 2005.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; BIRTLES, R. The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. **Clin Infect Dis.** v. 45, p. 95–102, 2007.

RAOULT D. Giant viruses from amoeba in a post-Darwinist viral world. **Intervirology.** v. 53, n. 5, p. 251–253, 2010.

RAOULT, D.; BOYER, M. Amoebae as Genitors and Reservoirs of Giant Viruses. **Intervirology.**v. 53, p. 321–329, 2010.

ROHWER F, PRANGISHVILI D, LINDELL D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology.** v. 11, p. 2771–2774, 2009.

SAADI, H.; PAGNIER, I.; COLSON, P.; CHERIF, J.K.; BEJI, M.; BOUGHALMI, M.; AZZA, S.; ARMSTRONG, N.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. **Clinical infectious diseases.** v. 57, n.4, p. 127-134, 2013a.

SAADI, H.; RETENO, D.G.; COLSON, P.; AHERFI, S.; MINODIER, P.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Shan virus*: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. **Intervirology.** v. 56, n. 6, p. 424-429, 2013b.

SCHEID, P.; HAURÖDER, B.; MICHEL, R. Investigations of an extraordinary endocytobiont in *Acanthamoeba* sp.: development and replication. **Parasitol Res.** v.106, n. 6, p. 1371-1377, 2010.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasite and Vectors.** v. 5, n. 6, p. 3-24, 2012.

SILVA, L.C.; ALMEIDA, G.M.; OLIVEIRA, D.B.; CAMPOS, R.K.; LA SCOLA, B.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. A resourceful giant: APMV is able to interfere with the human type I interferon system. **Microbes and Infection.** v. 16, p. 187-195, 2013.

SUTTLE, C.A. Viruses in the sea **Nature**, v 437, p. 356-361, 2005.

SUTTLE, C.A. Marine viruses -- major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology.** v. 5, p. 801–812, 2007.

SUN, S.; LA SCOLA, B.; BOWMAN, V.D.; RYAN, C.M.; WHITELEGGE, J.P.; RAOULT, D.; ROSSMANN, M.G. Structural Studies of the Sputnik Virophage. **Journal of Virology.** v. 84, n. 2, p. 894-897, 2010.

SUHRE, K.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus gene promoters exhibit an unprecedented conservation among all eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**v. 102, p. 14689–14693, 2005a.

SUHRE, K. Gene and Genome Duplication in *Acanthamoebapolyphaga mimivirus*. **Journal of Virology.** v. 79, n. 22, p. 14095–14101, 2005b.

SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. **Virus Research**. v. 117, p. 145–155, 2006.

SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; BARRASSI, L.; ESPINOSA, L.; RAOULT, D. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. **PLoS ONE**. v. 2, e328, 2007.

THOMAS, V.; BERTELLI, C., COLLYN, F. CASSON, N., TELENTI, A., GOESMANN, A., CROXATO, A.; GREUB, G. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. **Environmental Microbiology**. v. 13, n. 6, p. 1454–1466, 2011.

VANSPAUWEN, M.J.; FRANSEN, F.M.; RAOULT, D.; WOUTERS, E.F.; BRUGGEMAN, C.A.; LINSSEN, C.F. Infections with mimivirus in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Medicine**. v. 106, p. 1690-1694, 2012.

VISVESVARA, G. S., MOURA, H., SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 50, n. 1, p. 1-26, 2007.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 30, p. 151-158, oct. 2008.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPA ZIAN, L. Clinical significance of a positive serology for mimivirus in patients presenting a suspicion of ventilator-associated pneumonia. **Crit Care Med**. v. 37 p. 111-118, 2009.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPA ZIAN, L. Advances in Mimivirus Pathogenicity. *Intervirology*. v. 53, n. 5, p. 304–309, 2010.

XIAO, C.; CHIPMAN, P.R.; BATTISTI, A.J.; BOWMAN, V.D.; RENESTO, P.; RAOULT, D.; ROSSMANN, M.G. Structural Studies of the Giant Mimivirus. **PLoS Biology**. v. 7, n. 4, p.958-966, 2009.

YAMADA, T. Giant viruses in the environment: their origins and evolution. **Current Opinion in Virology**. v. 1, p. 58-62, 2011.

YAU, S.; LAURO, F.M.; DEMAERE, M.Z.; BROWN, M.V.; THOMAS, T.; RAFTERY, M.J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; LEWIS, M.; HOFFMAN, J.M.; GIBSON, J.A.; CAVICCHIOLI, R. Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. **Proc Natl Acad Sci**. v. 108, p. 6163-6168, 2011.

YOOSUF, N.; YUTIN, N.; COLSON, P.; SHABALINA, S.A.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; AZZA, S.; KLOSE, T.; WONG, J.; ROSSMANN, M.G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Related giant viruses in distant locations and different habitats: *Acanthamoeba polyphaga* moomouvirus represents a third lineage of the Mimiviridae that is close to the megavirus lineage. **Genome Biol Evol**. n. 4, v. 12, p. 1324-1330, 2012.

YOOSUF, N.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; COLSON, P. Draft genomes sequences of Terra1 and Terra2 viruses, new members of the family *Mimiviridae* isolated from soil. **Virology**. 452-453, p. 125–132, 2014a.

YOOSUF, N.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; ROBERT, C.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; COLSON, P. Complete genome sequence of Courdo11 virus, a

member of the family Mimiviridae. **Virus Genes**. n. 2, v. 48, p. 218 – 223, 2014b.

YUTIN, N.; WOLF, Y.I.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: Clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology Journal**.v.6, p. 223, 2009.

YUTIN, N.; KOONIN, E.V. Evolution of DNA ligases of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes: a case of hidden complexity. **Biology Direct**. v. 4, n. 51, p. 1-14, 2009.

YUTIN, N.; COLSON, P.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Mimiviridae: clusters of orthologous genes, reconstruction of gene repertoire evolution and proposed expansion of the giant virus family. **Virology Journal**. N. 10, v. 106, p. 1-13, 2013.

ZAUBERMAN, N.; MUTSAFI, Y.; HALEVY, D.B.; SHIMONI, E.; KLEIN, E.; XIAO, C.; SUN, S.; MINSKY, A. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. **PLoS Biol.**, v. 6, e114, 2008.

ANEXO I

Tabela 1: Reagentes utilizados para preparar o meio PYG (Meio Peptona Extrato de Levedura e Glicose)

Reagentes	Concentração	1 litro
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	8µM	0,98g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,5µM	0,2g
Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado (Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6H ₂ O)	5nM	0,06g
Fosfato dibásico de sódio heptahidratado (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	1,4mM	1,28g
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	2,5mM	0,34g
Citrato de sódio dihidratado (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O)	3,4mM	1,00g
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	0,05M	9,00g
Protease peptona		20,00g
Extrato de levedura		2,00g
Soro fetal bovino	7%	28mL (400mL de meio)
Penicilina G	200 U/mL	320µL (400mL de meio)
Gentamicina	50 µg/mL	284µL (400mL de meio)
Fungizona	2,5 µg/mL	320µL (400mL de meio)

ANEXO II

Protocolo de preparo das soluções utilizadas para a microscopia eletrônica de transmissão:

Solução Fixadora

- Glutaraldeído 25% ----- 6mL
 - Tampão fosfato 0,2M ----- 30mL
 - Água deionizada (q.s.p. 60 mL) ----- 24mL
- Volume final da solução: 60mL

Solução A: Fosfato de sódio monobásico 0,2M

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 5,37g
- Água deionizada ----- 100mL

Solução B: Fosfato de sódio dibásico 0,2M

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 5,37g
- Água deionizada ----- 100mL

Solução A+B: tampão fosfato 0,2M, pH 7,4

- Solução A ----- 19mL
- Solução B ----- 81mL

Volume final da solução: 100mL