

FÁBIO PIO DORNAS

**Estudos de prospecção, caracterização e ensaios
sorológicos de vírus gigantes: analisando amostras
ambientais brasileiras, soros de humanos e outros
vertebrados**

BELO HORIZONTE

Junho, 2016

FÁBIO PIO DORNAS

**Estudos de prospecção, caracterização e ensaios
sorológicos de vírus gigantes: analisando amostras
ambientais brasileiras, soros de humanos e outros
vertebrados**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia. Trabalho feito sob a orientação do Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão e coorientado pela Profa. Dra. Erna G. Kroon.

BELO HORIZONTE

Junho, 2016

À minha mamãe Solange pelo apoio e inspiração, sinônimo de guerreira.

Ao meu pai Roberto.

Aos meus irmãos Fernando e Fellipe, sinônimos de amor.

Aos meus mestres, sinônimos de ensinamentos.

Aos que são estão comigo, sinônimos de parceria.

AGRADECIMENTOS

É estranho lembrar que muito já se passou desde o dia em que defendi meu Mestrado e, com todo o amontoado de mudança, vim sentido Belo Horizonte, saindo de Ribeirão Preto, no estado de São Paulo. Eu chorei! O choro foi um misto de felicidade e saudade por muito do que havia ficado em Ribeirão Preto: alegrias e tristezas. Mais uma vez estava programando meu retorno à capital mineira, que nunca deixou de me acolher diante de minhas escolhas.

Desde lá, aconteceram situações que me fizeram ter quase certeza de iniciar o doutorado. Naquela época, tive apoio e incentivo para a realização dessa imaginária conquista, principalmente de dois amigos, além dos familiares que sempre disseram “sim” às minhas propostas pessoais, quaisquer elas fossem. E assim, inicio os meus agradecimentos por eles, por todos que me auxiliaram no início desta longa caminhada. Além disso, sem ordem de importância, agradeço também:

A Deus, a energia positiva que me faz mover, que me faz sentir que sempre existe algo me empurrando para frente e que me incentiva a olhar todas as situações com bons olhos!

Ao Jônatas que superou todas as minhas expectativas, tanto pela maneira de conduzir o grupo GEPVIG como pela forma de lidar com as particularidades de cada aluno, atentando-se às preocupações que faziam o discente ter mais esperança na ciência, nos estudos e nos objetivos profissionais. Muito obrigado, Jônatas, pelos quatro anos de intenso trabalho! Tenho admiração pelo seu esforço e pelo seu focado trabalho!

À UFMG, ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Departamento de Microbiologia, aos Doutores, Mestres e Professores, secretaria, amigos e colegas envolvidos com a minha tese e que de forma direta ou indireta dispensaram tempo para que eu chegasse à fase final de defesa. A todos, minha gratidão!

À galera da Pós-Graduação em microbiologia.

Ao LABVÍRUS, que muito me ensinou, pessoal e profissionalmente. Às discussões e às reuniões lá promovidas, em especial aos ensinamentos de lavagem, esterilização de vidrarias e demais materiais utilizados para a realização do trabalho experimental. Também aos congressos, às viagens, aos cafés, às festas, às defesas, aos momentos alegres, de descontração e de farras juntos, que felizmente não foram poucos! Especial agradecimento aos professores Erna Kroon, Giliane Trindade, Betânia Drumond, Claudio Bonjardim e Paulo Peregrino por fazerem do LABVÍRUS um laboratório de tradição. Também aos auxiliares e técnicos que trabalharam no laboratório e foram essenciais nos auxílios durante esses quatro anos;

Ao Professor Bernard La Scola, pela orientação de um ávido ano do doutorado sanduíche; e à *Aix Marseille Université* situada na França, juntamente com toda infraestrutura necessária para o trabalho desenvolvido nessa instituição.

À galera da *Aix Marseille Université*, à Valerie Filosa e à Lina Barassi, que foram muito atenciosas quando eu precisava de algo nessa instituição.

À Vanessa Müller e à Lorena por terem sido muito presente no meu período de doutorado sanduíche na França.

À Ana Theresa, Mônica e Itauá pelos empréstimos de ouvidos, ajudas, companhias, cervejas, risos em português e em francês, mútuas trocas de experiência e crescimento pessoal, marcantes viagens que foram incondicionais para que meu período na França fosse agradável.

Ana, você foi um grande achado e uma grande companhia durante meu período por aí. Loren, foi por pouco tempo, mas foi com muita fé em remar... Valeu cada segundo com vocês!

Aos meus amigos e colegas do GEPVIG, pela paciência comigo. Em especial, Loren e Paulo que, desde o início, me fizeram companhia durante alguns experimentos bem como me auxiliaram. Também ao aluno de iniciação científica Felipe Peixoto pela oportunidade de trabalho em conjunto. À Lud, à Loren, ao Paulo e ao Rodrigo pelas críticas e leitura da minha qualificação. Obrigado!

Aos meus amigos da vida real que estiveram comigo nos finais de semana, feriados, viagens, cervejadas, vinhos, petiscos e trocas de experiências... Obrigado pela força! Obrigado por serem ouvintes! Obrigado por tentarem me levar na brincadeira quando estou sério.

Ao Reginaldo que foi uma pessoa marcante durante esses anos.

À minha família por sempre se preocupar comigo e que, de várias formas, esteve comigo nesta caminhada.

Aos meus avós, tios e tias, primos e primas; em especial, aos meus padrinhos e madrinhas por sempre torcerem por mim.

À minha mãe Solange, por ser minha mamãe, amiga, irmã, tia, prima e tudo mais que eu precisei... mãe e mão financeira, psicológica; auxílio motor e suporte físico. Obrigado por ser minha confidente. Eu te amo demais, Mãe!

Ao meu pai Roberto que, da sua forma, sempre demonstrou sua responsabilidade, seu olhar preocupante e atencioso. Obrigado por ter me auxiliado, por ser meu pai e parte da minha base.

Aos meus irmãos, Fernando e Fellipe, de sangue e alma. Fernando mais próximo e atencioso; Fellipe, que com seu jeito, demonstra ser meu irmão em gestos que muito valem. Vocês são demais! Amo vocês!

Não posso deixar de agradecer em tempos do processo de *impeachment* da presidenta Dilma, ao Governo Federal, principalmente, às agências de fomento, CAPES e CNPq, que foram de extrema importância, pois foram as responsáveis pela administração financeira das minhas pesquisas e das minhas bolsas que me permitiram dedicar à minha formação. Às minhas bolsas de estudo do departamento de Microbiologia ICB/UFMG Capes 7, que me permitiram realizar o doutorado com dedicação exclusiva, e à bolsa do doutorado sanduíche por um ano na França, o que é raridade atualmente. Também envolvidos em financiamentos, agradeço à FAPEMIG e ao MAPA.

Aos que transmitem amor, sem distinção, que de todas as formas me fazem sentir mais humano e mais sensível.

A todos que de todas as formas me enviaram e enviam energias positivas.

De nenhuma forma conseguiria chegar até aqui sem estar com todos vocês. Vocês fazem parte desta conquista!

Abraços de urso e muito carinho,

Fábio

PS: Ainda em tempo, agradeço às pessoas presentes no dia da apresentação (colegas e amigos do LabVírus) por toda força e carinhos dispensados. Em especial, às tias Célia e Teresa, Fernando e Carol, e mamãe e papai pelo além da força e carinhos, terem vindo do interior. E também aos amigos Juliano e Cristiano.

“Aponta pra fé e rema...”

Dois barcos, Los Hermanos

RESUMO

Os atualmente conhecidos vírus gigantes têm sido agrupados junto à proposta ordem *Megavirales*, com base em características biológicas e filogenéticas. Assim muitas características únicas e pouco exploradas vêm sendo descritas na literatura a partir desse grupo de vírus, o que justifica novos estudos acerca de sua biologia e circulação. O objetivo deste trabalho foi estudar a distribuição e circulação de vírus gigantes através de análises de prospecção, caracterização e ensaios sorológicos, de amostras ambientais, de soros de humanos e de outros vertebrados, coletadas em território brasileiro. Esses estudos foram divididos em duas sessões. A primeira envolveu a análise de amostras ambientais coletadas em lagoas na região metropolitana de Belo Horizonte, e na Lagoa Central, município de Lagoa Santa, ambas de Minas Gerais. Espécies de amebas *Acanthamoeba spp.* e *Vermamoeba vermiformis* foram utilizadas como sistemas celulares de isolamento. Para a caracterização viral, foram feitos testes biológicos e moleculares. A segunda parte do estudo descreve a análise de amostras de soros de vertebrados (humanos, bovinos e primatas não-humanos), através de métodos moleculares e sorológicos para a detecção da circulação de mimivírus. Um total de 71 vírus foram isoladas e caracterizadas utilizando amostras ambientais brasileiras. Dentre os isolados, destacam-se a alta prevalência de mimivírus linhagem A e os primeiros mimivírus de linhagens B e C, que foram isolados e identificados a partir de espécimes ambientais brasileiros, assim como novas amostras de marseillevírus e pandoravírus. Um novo mimivírus da linhagem A, denominado de *Kroon virus*, foi caracterizado. Em relação às análises sorológicas, foi observada uma positividade entre 4,7% e 31,6% nos testes de neutralização viral e entre 8,5% e 42,1% em relação à detecção de genoma viral. A análise das sequências nucleotídicas virais obtidas a partir das sorotecas revelaram polimorfismos únicos, sugerindo diversidade genética, mesmo considerando genes conservados. Todavia, o significado biológico destes achados no contexto de eventuais patologias nas espécies de vertebrados analisados permanece a ser investigado. Em conjunto, os dados apresentados no presente trabalho mostram uma alta diversidade de vírus gigantes que circulam ativamente no território brasileiro, e sugerem que as espécies de vertebrados analisadas se apresentam em exposição a estes vírus.

Palavras-chave: mimivírus; marseillevírus; pandoravírus; isolamento viral; ensaios sorológicos; vertebrados.

ABSTRACT

The giant viruses have been grouped into the proposed order *Megavirales* due to particular biological and phylogenetic characteristics. Exclusive characteristics have been described, supporting new studies about the biology and circulation of giant viruses. The objective of this work was to analyze the distribution and circulation of giant viruses by approaches involving the prospection in environmental samples and characterization of new isolates and by analyzing the presence of neutralizing antibodies and viral DNA in vertebrates sera samples (humans, bovines and non-human primates). These studies were divided in two sections. The first involving analysis of environmental samples collected from lake around Belo Horizonte city, Minas Gerais state. The amoebas' species *Acanthamoeba spp.* and *Vermamoeba vermiformis* were used as cellular systems for viral isolation assays. Viral characterization, was done by biological and molecular assays. For the second section, sera samples were analyzed by viral neutralizing assays and by PCR and sequencing of mimiviral genes. We report the isolation of 70 new giant viruses in this study. Mimivirus lineages B and C were first reported in Brazilian environmental samples, as well as new isolates of marseillevirus and pandoravirus. One new mimivirus lineage A, named *Kroon virus*, was characterized. Regarding serological analysis, and considering the different sera collections, we observed positivity ranging from 4.7% to 31.6% in neutralizing assays and 8.5% to 42.1% for mimiviral DNA detection. A number of polymorphisms were observed in mimivirus sequences amplified from sera samples, even considering conserved viral genes. However, the biological mean of the detection of antibodies-against mimivirus and mimivirus DNA in vertebrates remains to be investigated. Taken together, the dataset presented in this work demonstrate the active circulation of giant viruses in Brazilian territory and suggest that the analyzed vertebrate's species are under explosion to those viruses.

Keywords: mimivirus; marseillevirus; pandoravirus; viral isolation; serological assays; vertebrates.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Produção relacionada ao trabalho aqui descrito

Artigos científicos publicados

- A Brazilian Marseillevirus Is the Founding Member of a Lineage in Family Marseilleviridae. **Dornas FP***, Assis FL*, Aherfi S, Arantes T, Abrahão JS, Colson P, La Scola B. *Viruses*. 2016 Mar 10;8(3). * Divisão de primeira autoria
- Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. **Dornas FP**, Khalil JY, Pagnier I, Raoult D, Abrahão J, La Scola B. *Front Microbiol*. 2015 Oct 6;6:1086.
- Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire. Rodrigues RA, Dos Santos Silva LK, **Dornas FP**, de Oliveira DB, Magalhães TF, Santos DA, Costa AO, de Macêdo Farias L, Magalhães PP, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Cortines JR, Abrahão JS. *J Virol*. 2015 Dec 1;89(23):11812-9.
- Pan-Genome Analysis of Brazilian Lineage A Amoebal Mimiviruses. Assis FL, Bajrai L, Abrahao JS, Kroon EG, **Dornas FP**, Andrade KR, Boratto PV, Pilotto MR, Robert C, Benamar S, Scola BL, Colson P. *Viruses*. 2015 Jun 26;7(7):3483-99.
- Modulation of the expression of mimivirus-encoded translation-related genes in response tonutrient availability during Acanthamoeba castellanii infection. Silva LC, Almeida GM, Assis FL, Albarnaz JD, Boratto PV, **Dornas FP**, Andrade KR, La Scola B, Kroon EG, da Fonseca FG, Abrahão JS. *Front Microbiol*. 2015 Jun 1;6:539.
- Oysters as hot spots for mimivirus isolation. Andrade KR, Boratto PP, Rodrigues FP, Silva LC, **Dornas FP**, Pilotto MR, La Scola B, Almeida GM, Kroon EG, Abrahão JS. *Arch Virol*. 2015 Feb;160(2):477-82.
- Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. Abrahão JS*, **Dornas FP***, Silva LC*, Almeida GM, Boratto PV, Colson P,

La Scola B, Kroon EG. Virol J. 2014 Jun 30;11:120. Review. Divisão de primeira autoria*

- Growing a giant: evaluation of the virological parameters for mimivirus production. *Abrahão JS, Boratto P, **Dornas FP**, Silva LC, Campos RK, Almeida GM, Kroon EG, La Scola B. J Virol Methods. 2014 Oct;207:6-11.*
- Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Campos RK, Boratto PV, Assis FL, Aguiar ER, Silva LC, Albarnaz JD, **Dornas FP**, Trindade GS, Ferreira PP, Marques JT, Robert C, Raoult D, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS. Virol J. 2014 May 14;11:95.*
- Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil. ***Dornas FP**, Rodrigues FP, Boratto PV, Silva LC, Ferreira PC, Bonjardim CA, Trindade GS, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS. Emerg Infect Dis. 2014 Mar; 20(3):469-72.*
- Acanthamoeba polyphaga mimivirus stability in environmental and clinical substrates: implications for virus detection and isolation. ***Dornas FP***, Silva LC*, de Almeida GM, Campos RK, Boratto PV, Franco-Luiz AP, La Scola B, Ferreira PC, Kroon EG, Abrahão JS. PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e87811. * Divisão de primeira autoria*
- A resourceful giant: APMV is able to interfere with the human type I interferon system. *Silva LC, Almeida GM, Oliveira DB, **Dornas FP**, Campos RK, La Scola B, Ferreira PC, Kroon EG, Abrahão JS. Microbes Infect. 2014 Mar;16(3):187-95.*
- Amoebas as mimivirus bunkers: increased resistance to UV light, heat and chemical biocides when viruses are carried by amoeba hosts. *Boratto PV, **Dornas FP**, Andrade KR, Rodrigues R, Peixoto F, Silva LC, La Scola B, Costa AO, de Almeida GM, Kroon EG, Abrahão JS. Arch Virol. 2014 May;159(5):1039-43.*

Artigos científicos submetidos

- Mimivirus: detection of viral genome and neutralizing antibodies in humans, Brazil. ***Dornas FP**; Costa, GB; Silva, LCFS; Boratto PVM; Kroon EG; La Scola, B; Trindade G; Abrahão JS. Submetido para: Journal of Clinical Virology.*
- Isolation of Potentially Pathogenic Acanthamoeba T4 from Remote Savanna-like Areas with Low Anthropogenic Impact, Brazil. *Silva, LCFS*, Arantes T*, **Dornas FP***, Turrini F, Abrahão WAP, Kroon EG, Costa AO, Abrahão JS. * Divisão de primeira autoria*