

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

FERNANDA GIL DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO ORPHEOVÍRUS E
ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE *Nucleocytoviricota*

Belo Horizonte
2021

Fernanda Gil de Souza

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO ORPHEOVÍRUS E
ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE *Nucleocytoviricota***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

Belo Horizonte
2021

043

Souza, Fernanda Gil de.

Caracterização do ciclo de multiplicação do orpheovírus e análise comparativa do transcriptoma de Nucleocytoviricota [manuscrito] / Fernanda Gil de Souza. – 2021.

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

Orientador: Rodrigo Araújo Lima Rodrigues.

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

1. Microbiologia. 2. Vírus. 3. Acanthamoeba. 4. Transcriptoma. 5. Fagocitose. 6. Morfogênese. I. Rodrigues, Rodrigo Araújo Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **FERNANDA GIL DE SOUZA**

Nº REGISTRO: **2018708702**

Às 14:00 horas do dia **06 de agosto de 2021**, reuniu-se, de forma remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Thalita Souza Arantes, Graciela Kunrath Lima, Jaquelline Germano de Oliveira, Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar e o Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues – Orientador, para julgar o trabalho final “Caracterização do ciclo de multiplicação do orpheovírus e análise comparativa do transcriptoma de Nucleocytoviricota”, do aluna **Fernanda Gil de Souza**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de agosto de 2021. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da banca:

Profa. Dra. Thalita Souza Arantes

Profa. Dra. Graciela Kunrath Lima

Profa. Dra. Jaquelline Germano de Oliveira

Prof. Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar

De acordo:

Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

(Orientador)

Profa. Danielle da Glória de Souza (Coordenadora do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia)

Belo Horizonte, 06 de agosto de 2021



Documento assinado eletronicamente por **Eric Roberto Guimaraes Rocha Aguiar, Usuário Externo**, em 09/08/2021, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Usuário Externo**, em 09/08/2021, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) decurso de pós-graduação**, em 09/08/2021, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graciela Kunrath Lima, Chefe de setor**, em 09/08/2021, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaquelline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 12/08/2021, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THALITA SOUZA ARANTES, Usuário Externo**, em 24/08/2021, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0824650** e o código CRC **B255259C**.

AGRADECIMENTOS

Como em todas as áreas da ciência, nada é realizado sem parcerias e contribuições. Durante meu percurso no doutorado contei com o apoio de muitos colegas do laboratório de vírus que me ajudaram nos momentos difíceis, nas dúvidas e nas alegrias. Agradeço imensamente estes colegas de laboratório, principalmente os colegas do GEPVIG. Aos professores do laboratório que vírus pelos ensinamentos e conselhos dados. Ao Rodrigo e Jônatas que estiveram junto no desenvolvimento dessa tese com muita paciência e sanando diversas dúvidas e me ajudando com discussões sobre o tema e me guiando nessa jornada.

Agradeço imensamente a minha família, principalmente minha mãe, meu irmão e meu pai que me apoiaram e estiveram me ajudando mesmo que na distância. Por fim, sou grata as minhas amigas do meu antigo laboratório LMM que também à distância me ajudaram nesse período com muito apoio e amizade.

RESUMO

A descoberta do primeiro vírus gigante, o *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus, impulsionou debates acerca da classificação dos vírus e seu processo evolutivo. Diversos novos vírus gigantes têm sido isolados nos últimos anos utilizando variadas plataformas de isolamento como orpheovírus em *V. vermiformis*. Esse grupo, denominado genericamente de vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV), apresenta características únicas nunca observadas anteriormente em outros vírus, como o tamanho de suas partículas e genomas complexos. Além disso, apresentam capacidade de regular temporalmente a expressão de seus genes. Na medida em que novos isolados são descobertos, estudos têm sido conduzidos com objetivo de aumentar o conhecimento acerca de sua biologia e interação com hospedeiro. Neste estudo foi observado que a infecção pelo orpheovírus é capaz de mudar morfologicamente a célula hospedeira e causar aumento de motilidade celular. Nossos dados também demonstraram que em etapas iniciais do ciclo de multiplicação do orpheovírus, a fagocitose é explorada como mecanismo de penetração das partículas, seguido pela formação de fábricas virais (FV) elétrons-luscentes. Foi observado um intenso acúmulo de mitocôndria e membranas ao redor da FV, características importantes no processo de morfogênese, que tem início com a formação de crescentes que se estendem até a formação da partícula madura. Foi observado também mediante contagem de partículas, que estas seriam liberadas da célula hospedeira por exocitose. Além disso, ao realizar uma análise comparativa do transcriptoma de diferentes NCLDV, observou-se como característica comum a este grupo um perfil temporal de expressão de seus genes ao longo do ciclo de multiplicação, característica que aparentemente se manteve ao longo da evolução deste grupo de vírus. Os genes expressos foram classificados em classes temporais denominadas precoces, intermediários e tardios. Além disso, observamos que genes envolvidos com morfogênese viral são preferencialmente expressos em momentos mais tardios, enquanto genes envolvidos na transcrição e replicação de DNA são em sua maioria expressos em tempos mais precoces. Dos genes expressos pelo *Marseillevirus*, 17% foram classificados como precoces, 48% como intermediários e 33% como genes de expressão tardia. As principais funções observadas para genes precoces estão relacionadas à replicação e recombinação do DNA, transcrição e transdução de sinal, para genes intermediários genes relacionados à replicação do DNA e em etapas tardias genes estruturais. Um perfil funcional semelhante dos genes precoces e intermediários foi observado tanto para mimivírus quanto para vaccínia vírus (VACV) e Frog vírus 3 (FV-3). Entretanto, para FV-3 e VACV, genes relacionados à

morfogênese e estrutura foram observados sendo expressos também em tempos intermediários e precoces. Desta forma, apesar de um padrão comum de expressão temporal gênica dos vírus analisados ser observado, sendo uma característica possivelmente herdada do último ancestral comum dos *Nucleocyotviricota*, é mais provável que cada grupo viral tenha uma história diferente de ganho e perda de gene, possivelmente devido à interação com distintos hospedeiros. Entender como os genes de um determinado patógeno são expressos fornece dados que auxiliam no entendimento tanto de sua biologia quanto na interação com seus hospedeiros.

Palavras chave: vírus gigantes, orpheovírus, ciclo de multiplicação, transcriptoma, análise funcional.

ABSTRACT

The discovery of the first giant virus, the *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus, promoted debates about virus classification and its evolutionary process. Several new giant viruses have been isolated in recent years using different isolation platforms, as orpheovirus in *V. vermiformis*. This group, generically called nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV), has unique characteristics never seen before in other viruses, such as the size of its viral particles, as well as the complexity of the genomes. In addition, they have the ability to temporarily regulate the expression of their genes. As new isolates have been discovered, studies have been conducted with the aim of increasing knowledge about their biology and interaction with the host. This is possible through more in-depth investigations related to the multiplication cycle of these microorganisms. Thus, in this study it was observed that infection by the orpheovirus is capable of morphologically changing the host cell and causing increased cell motility. Our data also demonstrated, that in the early stages of the orpheovirus multiplication cycle, phagocytosis is exploited as entry mechanism, and after entry, electron-lucent viral factories are formed. It was observed an intense recruitment of mitochondria and membranes that are important in the process of morphogenesis, that begins with the formation of crescents that extend until the formation of the mature particle. It was also observed by counting particles, that they would be released from the host cell by exocytosis. In addition, when performing a comparative analysis of the transcriptome of different NCLDV, a temporal profile of expression of their genes throughout the multiplication cycle was observed as a common characteristic of this group, which apparently remains throughout the evolution of this group of viruses. Furthermore, we observed that genes involved in viral morphogenesis are preferentially expressed at later times, while genes involved in DNA transcription and replication are mostly expressed at earlier times. Of the genes expressed by Marseillevirus, 17% were classified as early, 48% as intermediate and 33% as late expression genes. The main functions observed for early genes are related to DNA replication and recombination, transcription and signal transduction. For intermediate genes are related to DNA replication and in late stages structural genes. A similar functional profile of early and intermediate genes was observed for both mimiviruses and vaccinia virus (VACV) and Frog virus 3 (FV-3). However, for FV-3 and VACV genes related to morphogenesis and structure were also observed to be expressed at intermediate and early times. Thus, although a common pattern of temporal gene expression of the analyzed viruses was observed, being a feature possibly inherited from

the last common ancestor of Nucleocytoviricota, it is more likely that each viral group had a different history of gene gain and loss, possibly due to the interaction with different hosts. Understanding how the genes of a particular pathogen are expressed provides data that help to understand both its biology and interaction with its hosts. Understanding how the genes of a particular pathogen are expressed provides data that help in understanding its biology and interaction with its hosts.

Keywords: Giant viruses, orpheovirus, replication cycle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa da coloração de Gram realizada em amostras de água de um hospital na cidade de Bradford, Inglaterra, em 1992.

Figura 2: Microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula viral de mimivírus de célula infectada.

Figura 3: Imagem de uma partícula de mimivírus (APMV) ao microscópio eletrônico de transmissão.

Figura 4: Esquema do ciclo de multiplicação de mimivírus.

Figura 5: Imagem de MET evidenciando células de *A. castellanii* infectadas com Merseillevírus.

Figura 6: Imagem de MEV e MET de partículas de pandoravírus sendo fagocitadas.

Figura 7: Imagem de MET de partículas de pithovírus.

Figura 8: Imagem de MET de partículas de cedratvírus.

Figura 9: Esquema do ciclo de multiplicação do cedratvírus.

Figura 10: Mapa esquemático da distribuição de *V. vermiformis*.

Figura 11: Imagem de MET evidenciando células de *V. vermiformis* infectadas por Faustovírus.

Figura 12: Imagem de MET evidenciando células de *V. vermiformis* infectadas com kaumoebavírus.

Figura 13: Imagem de MET evidenciando fábricas virais de tupanvírus.

Figura 14: Imagem de MET evidenciando partículas de yasminevírus.

Figura 15: Imagem de MET evidenciando partículas de orpheovírus.

Figura 16: Caracterização do efeito citopático de orpheovírus por microscopia óptica e gráfico de contagem de células.

Figura 17: Caracterização do ciclo de orpheovírus em *V. vermiformis* através de ensaio de imunofluorescência (IF).

Figura 18: Passos iniciais da multiplicação de orpheovírus em sua célula hospedeira.

Figura 19: Imagem de MET das FV formadas por orpheovírus.

Figura 20: Imagem de MEV e MET demonstrando a formação de *blebs* mediante infecção por orpheovírus.

Figura 21: Morfogênese das partículas de orpheovírus.

Figura 22: Gráficos de curva de ciclo único.

Figura 23: Imagem de MET evidenciando a ultraestrutura de partículas de orpheovírus.

Figura 24: Imagem de MET de partículas defectivas de orpheovírus.

Figura 25: Etapas finais do ciclo de multiplicação do orpheovírus.

Figura 26: Imagem de MEV de partículas liberadas por exocitose e lise celular.

Figura 27: Gráfico de função de genes precoces, intermediários e tardios de Marseillevírus.

Figura 28: Gráfico de função de genes precoces, intermediários e tardios de mimivírus.

Figura 29: Gráfico de função de genes precoces, intermediários e tardios de iridovírus.

Figura 30: Gráfico de função de genes precoces, intermediários e tardios de poxvírus.

Figura 31: Gráfico comparativo de função de genes precoces, intermediários e tardios de Marseillevírus, mimivírus, iridovírus e poxvírus.

LISTA DE ABREVIATURAS

APMV	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CroV	<i>Cafeteria roenbergensis virus</i>
FV	Fábricas virais
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria chlorella virus 1</i>
ASFV	<i>African swine fever vírus</i>
AVL	Amebas de vida livre
CPXV	Cowpox
DpAV 4a	<i>Diadromus pulchellusascovirus 4a</i>
HvAV 3a	<i>Heliothis virescens ascovirus 3a</i>
IF	Imunofluorescência
M.O.I	Multiplicidade de infecção
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPXV	Monkeypox
NCBI	Centro Nacional de informação Biotecnológica
NCLDV	Vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA
PCR	Reação em cadeia da plimerase
PYG	Peptona, extrato de levedura e glicose
SfAV 1a	<i>Spodoptera frugiperda ascovirus 1a</i>
TnAV 2a	<i>Trichoplusia ni ascovirus 2a</i>
VACV	vaccínia
VARV	vírus da varíola

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	14
CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.2 Descoberta dos vírus gigantes.....	18
1.3 Características biológicas e do ciclo de multiplicação de alguns vírus gigantes isolados em <i>Acanthamoeba</i>	20
1.3.1 Família <i>Mimiviridae</i>	21
1.3.2 Família <i>Marseilleviridae</i>	24
1.3.3 Pandoravírus.....	25
1.3.4 Pithovírus.....	27
1.3.5 Cedratvírus.....	28
1.4 Características biológicas e do ciclo de multiplicação de vírus gigantes isolados em <i>Vermamoeba vermiformis</i>	29
1.4.1 Faustovírus.....	31
1.4.2 Kaumobavírus.....	33
1.4.3 Tupanvírus.....	34
1.4.4 Yasminevírus.....	35
1.4.5 Orpheovírus.....	36
2. OBJETIVOS	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Meio para cultivo celular PYG (Peptona/ Extrato de levedura/ Glicose).....	38
3.2 <i>Vermamoeba vermiformis</i> (ATCC CDC19).....	39
3.3 Vírus.....	39
3.4 Propagação viral.....	39
3.5 Titulação viral.....	40
3.6 Ensaios de caracterização de efeito citopático, curva de ciclo único e contagem de partículas.....	40
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	41
3.8 Microscopia eletrônica de varredura.....	42
3.9 Ensaio de Imunofluorescência.....	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Análise aprofundada de etapas do ciclo de multiplicação de Orpheovírus em <i>V. vermiformis</i>	43
4.1.1 A caracterização do efeito citopático do orpheovírus evidencia alterações morfológicas e aumento da motilidade de <i>V. vermiformis</i>	43

4.1.2 Orpheovírus é fagocitado e induz a formação de FV elétron-lucentes e alterações citoplasmáticas envolvendo diferentes organelas.	47
4.1.3 Dinâmica de morfogênese de novas partículas de orpheovírus	50
4.1.4 Liberação de partículas de orpheovírus por lise ou exocitose	53
CAPÍTULO II.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
1.1 Expressão gênica temporal em NCLDV	56
1.2 Expressão gênica temporal em Poxviridae.....	58
1.3 Expressão gênica temporal em Iridoviridae	59
1.4 Expressão gênica temporal em Mimiviridae e Marseilleviridae	60
2. OBJETIVOS	62
2.2 Objetivos específicos.....	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1 Análise funcional de genes expressos em momentos precoces, intermediários e tardios de infecção de NCLDV	62
4 RESULTADOS	64
4.1 Avaliação do transcriptoma do Marseillevírus (Marseilleviridae).....	64
4.2 Avaliação do transcriptoma do Acanthamoeba polyphaga mimivirus (Mimiviridae) .	66
4.3 Avaliação do transcriptoma do vaccinia virus (Poxviridae).....	67
4.2 Avaliação do transcriptoma do Frog virus 3 (Iridoviridae).....	68
4.3 Análise comparativa do transcriptoma de Nucleocytoviricota	69
DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

PREFÁCIO

Ao iniciar em abril de 2018 o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG, o tema de tese proposto inicialmente era descrever etapas que ainda necessitavam de elucidação dos ciclos de multiplicação de vírus gigantes isolados em *Vermamoeba vermiformis*. A primeira etapa do estudo, a qual foi iniciada no segundo semestre de 2018 foi realizado com objetivo de descrever detalhadamente o ciclo de multiplicação, bem como características biológicas e de interação com hospedeiro do Orpheovírus, o qual foi cedido gentilmente pelo professor Bernard La Scola (Aix-Marseille Université/França). Esta etapa foi concluída e publicada em 2019 no periódico Virology Journal, bem como apresentado em eventos na forma de pôster e oral.

Em 2020, com o início da pandemia da COVID-19, o projeto sofreu adequações à nova realidade. Para poder dar continuidade, teve início a segunda etapa da tese, a qual está relacionada a análise de dados de transcriptoma de diferentes NCLDV baseado em dados obtidos em estudos anteriores. A análise teve início em 2020 e teve como objetivo estudar o perfil transcricional e analisar as funções de cada classe de genes expressos, verificando assim padrões comuns dentre os integrantes estudados pertencentes aos NCLDV. Este trabalho foi concluído em 2021 e publicado no periódico Pathogens. Neste mesmo período junto com o desenvolvimento da segunda etapa da tese também foram desenvolvidos projetos paralelos relacionados à SARS-CoV -2 e também auxílio no diagnóstico de SARS-CoV-2 demandado pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais no enfrentamento à pandemia de COVID 19.

Desta forma, esta tese foi dividida em dois capítulos, cada um compilando as atividades realizadas e os resultados obtidos referentes aos projetos mencionados acima.

JUSTIFICATIVA

Muito da virologia moderna foi construída considerando os vírus que acometem os seres humanos, bem como animais e plantas de interesse econômico, contribuindo para a construção de uma virosfera antropocêntrica. Apesar disso, sabe-se que a grande maioria destas entidades biológicas não estão associadas diretamente a estes organismos. Cada vez mais é necessário estudo de vírus que não infetam humanos para compreensão de fenômenos biológicos novos. O maior interesse por estes, como os vírus gigantes de ameba, possibilitou a descoberta de centenas de novas espécies. Porém, ainda existem poucos isolados utilizando *V. vermiformis* como plataforma de isolamento.

Apesar de os mimivírus apresentarem o maior número de representantes e serem bem caracterizados pela literatura, há pouca informação sobre outros grupos de vírus gigantes, assim como algumas etapas do ciclo de multiplicação e função de algumas proteínas ainda não totalmente compreendidas. Os vírus gigantes apresentam diferenças notáveis acerca do ciclo de multiplicação e estrutura dos vírions de cada grupo. Além disso, estes vírus apresentam capacidade de regular temporalmente a expressão de seus genes, algo comum em todos os vírus gigantes conhecidos até o momento. Desta forma, estudos visando maior compreensão das particularidades de cada etapa do ciclo de multiplicação, bem como sua interação com hospedeiro são importantes para melhor entendimento da diversidade de características deste grupo de vírus.

Além de informações sobre a biologia e aspectos do ciclo de multiplicação dos vírus pertencentes ao filo *Nucleocytoviricota* serem necessárias, muitos aspectos relacionados ao perfil transcricional destes vírus ainda não estão completamente elucidados. Compreender de forma mais aprofundada como estes mecanismos ocorrem nos fornecem também informações sobre sua interação com hospedeiro e nos permitem inferir sobre sua história evolutiva. Desta forma, o presente trabalho buscou fornecer valiosas informações para elucidação de etapas do ciclo de multiplicação do orpheovírus, contribuindo assim para maior compreensão desse novo vírus gigante. Ainda, por meio de amplas análises comparativas dos transcriptomas disponíveis dos vírus gigantes, buscamos compreender melhor o perfil de regulação e expressão gênica de *Nucleocytoviricota*.

CAPÍTULO I
CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO ORPHEOVÍRUS EM
Vermamoeba vermiformis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA

Os vírus foram primeiramente descritos no final do século dezenove, como agentes infecciosos filtráveis e ultramicroscópicos (LWOFF, 1957). São tradicionalmente conhecidos por serem entidades parasitas intracelulares obrigatórios e por apresentarem pequenas dimensões, além de pequenos genomas capazes de codificar proteínas estruturais e não estruturais (VAN ET TEN *et al.*, 2010). No entanto, após a descoberta do *Paramecium bursaria chlorella virus 1* (PBCV-1), que foi classificado sendo pertencente à família *Phycodnaviridae*, foi criado um novo grupo de vírus denominado vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCLDV) (VAN ET TEN E MEINTS, 1999). Este grupo de vírus apresenta características distintas de outros já descritos, como tamanho das partículas e do genoma, certo grau de independência do sistema transcricional do hospedeiro, e o ciclo de multiplicação viral ocorre parcialmente no citoplasma da célula hospedeira (COLSON *et al.*, 2011; COLSON *et al.*, 2012).

No grupo dos NCLDV, atualmente está incluída a família *Asfarviridae* constituída por vírus envelopados, de simetria icosaédrica com aproximadamente 170-190 nm de diâmetro capazes de infectar suínos. Esta família tem como principal representante o African swine fever virus (ASFV), pertencente ao gênero *Asfivirus*, o qual é transmitido por carrapatos do gênero *Ornithodoros*. Seu genoma é constituído de uma dupla fita de DNA (dsDNA) podendo variar entre 160 a 190 kpb, capaz de codificar entre 151 a 167 ORFs (GALINDO *et al.*, 2017).

A família *Poxviridae* também faz parte o grupo dos NCLDV. Atualmente em sua classificação é dividida em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae* composta pelos gêneros *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*, nos quais estão classificadas as espécies capazes de infectar insetos, e *Chordopoxvirinae*, constituída por dez gêneros em que estão classificados os vírus que infectam vertebrados. Dentre os vírus mais conhecidos e estudados estão o vírus da varíola (VARV), vaccínia (VACV), cowpox (CPXV) e monkeypox (MPXV) pertencentes à subfamília *Chordopoxvirinae*, sendo responsáveis por diversos surtos de doenças exantemáticas, tanto em humanos quanto em animais. Apresentam uma morfologia complexa de aproximadamente 250 nm, e seu genoma é composto de dsDNA linear, variando de 128 a 365 kpb em seu tamanho, o qual codifica aproximadamente 200 genes

(OLIVEIRA *et al*, 2017; KROON *et al*, 2011).

A família *Iridoviridae*, também pertencente a este grupo, é dividida em duas subfamílias. *Alphairidovirinae* é constituída pelos gêneros *Ranavirus*, *Megalocytivirus* e *Lymphocystivirus*. Os membros pertencentes a estes três gêneros são capazes de infectar vertebrados ectotérmicos como peixes, anfíbios e répteis, tendo como principal representante o *Frog virus 3*, pertencente ao gênero *Ranavirus*. No entanto, as espécies que constituem a subfamília *Betairidovirinae*, na qual pertencem os gêneros *Iridovirus* e *Chloriridovirus* infectam insetos e crustáceos. Possuem partículas não-envelopadas de simetria icosaédrica variando entre 150- 200 nm de diâmetro. O genoma é constituído de dsDNA linear de aproximadamente 103-220 kpb, sendo capaz de codificar entre 92-211 proteínas preditas (CHINCHAR *et al*, 2017).

A família *Ascoviridae* é dividida nos gêneros denominados *Ascovirus* e *Toursvirus*. As espécies pertencentes a estes gêneros infectam estágios imaturos de insetos, em sua maioria os pertencentes à família Noctuidae, e são transmitidos através de vetores da família Braconidae e Ichneumonidae. O gênero *Ascovirus* inclui as espécies *Spodoptera frugiperda ascovirus 1a* (SfAV 1a), *Trichoplusia ni ascovirus 2a* (TnAV 2a) e *Heliothis virescens ascovirus 3a* (HvAV 3a), enquanto o gênero *Toursvirus* contém somente a espécie *Diadromus pulchellus ascovirus 4a* (DpAV 4a) (HAN *et al.*, 2018). As partículas possuem aproximadamente 130 nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento, e apresentam formato baciliforme, ovóide ou alantóide de acordo com a espécie. Seu genoma é composto de dsDNA circular de aproximadamente 100-200 kpb, e codifica entre 117 e 180 proteínas (ASGARI *et al.*, 2017).

Além das famílias descritas, a família *Phycodnaviridae* também pertence ao grupo dos NCLDV. Seus membros são caracterizados por infectar algas e são classificados nos gêneros *Chlorovirus*, *Coccolithovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus* e *Raphidovirus*. Apresentam partículas de simetria icosaédrica que variam entre 120-220 nm de diâmetro. O genoma é composto de dsDNA de aproximadamente 100-550 kb variando de acordo com a espécie, e apresenta conteúdo de G+C entre 40 e 50% (WILSON *et al.*, 2009).

Os vírus pertencentes ao grupo dos NCLDV caracterizam-se por apresentar um extenso genoma de DNA (entre 100 kb e 2,2 Mb), capaz de codificar genes para proteínas necessárias no processo de replicação e reparo do material genético como DNA polimerases, helicases,

toposoimerases e chaperonas (YUTIN *et al.*, 2009; RAOULT *et al.*, 2004). Além disso, apresentam um conjunto de 30 genes homólogos conservados na maioria dos vírus que auxiliam no processo de replicação, metabolismo do DNA, montagem e empacotamento do capsídeo (FILÉE *et al.*, 2010). De acordo com análises filogenéticas e filéticas, alguns autores propõem que estes vírus se originam de um mesmo ancestral comum (COLSON *et al.*, 2012; COLSON *et al.*, 2013). Atualmente foi proposta uma nova classificação, sendo este grupo pertencente à classe *Megaviricetes* e *Pokkesviricetes* no caso das famílias *Asfaviridae* e *Poxviridae*, sendo pertencentes ao filo *Nucleocytoviricota* (KOONIN *et al.*, 2020).

Subsequentemente a descoberta do *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), cuja espécie é pertencente à família *Mimiviridae*, o grupo obteve maior notoriedade e consequentemente aumento do interesse e pesquisas. Sendo assim, muitos isolados foram obtidos a partir de estudos de prospecção que buscam obter mais informações acerca da diversidade e dispersão destes vírus. Desta forma, as famílias *Mimiviridae* e *Marseilleviridae* passaram a integrar o grupo dos NCLDV (LA SCOLA *et al.*, 2003; COLSON *et al.*, 2013). Além disso, com os novos estudos o grupo dos NCLDV foi cada vez mais sendo ampliado e avançando também em sua classificação taxonômica, formando assim um novo filo mencionado anteriormente denominado *Nucleocytoviricota*. (PHILIPPE *et al.*, 2013; RETENO *et al.*, 2015; BAJRAI *et al.*, 2016; ANDREANI *et al.*, 2016; LEGENDRE *et al.*, 2014; LEGENDRE *et al.*, 2015; ANDREANI *et al.*, 2017; ANDREANI *et al.*, 2018; YOSHIKAWA *et al.*, 2019; KOONIN *et al.*, 2020).

1.2 Descoberta dos vírus gigantes

O primeiro vírus gigante foi isolado a partir de amostras de água oriundas de torres de resfriamento de ar condicionado durante a investigação de um surto de pneumonia em um hospital de Bradford, na Inglaterra em 1992. Com o objetivo de caracterizar microrganismos patogênicos associados a amebas, os pesquisadores inocularam as amostras de água em culturas de *Acanthamoeba polyphaga* e observaram a presença de supostos cocos Gram-positivos, denominados à época “cocos de Bradford” (Fig. 1). Estes microrganismos apresentaram um perfil de resistência completa aos antibióticos testados e não apresentaram amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene 16S DNA ribossomal, comumente utilizados na caracterização de bactérias (LA SCOLA *et al.*, 2003; RAOULT *et al.*, 2007).

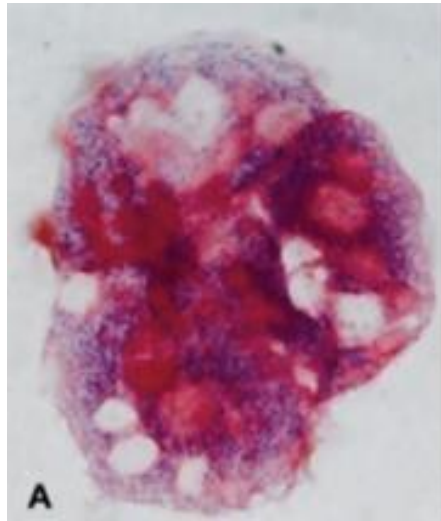


Figura 1. Microscopia óptica em que se observa APMV (pontos em violeta) no interior de uma célula de ameba utilizando a coloração pelo método de Gram. Fonte: RAOULT *et al.*, 2007.

No início dos anos 2000, pesquisadores da Universidade de Marseille, na França, sob orientação do Dr. Didier Raoult, realizaram estudos mais aprofundados, e observaram a partir de microscopia eletrônica, a presença de estruturas icosaédricas semelhantes a estruturas já observadas nos iridovírus, porém com aproximadamente 750 nm de diâmetro (Fig. 2). Após sequenciamento e análise do genoma, foi confirmado que o microrganismo se tratava de um novo vírus, o APMV (LA SCOLA *et al.*, 2003; RAOULT *et al.*, 2007). Por apresentarem características distintas de outros vírus, o gênero *Mimivirus* e a família *Mimiviridae* foram criadas (LA SCOLA *et al.*, 2003).

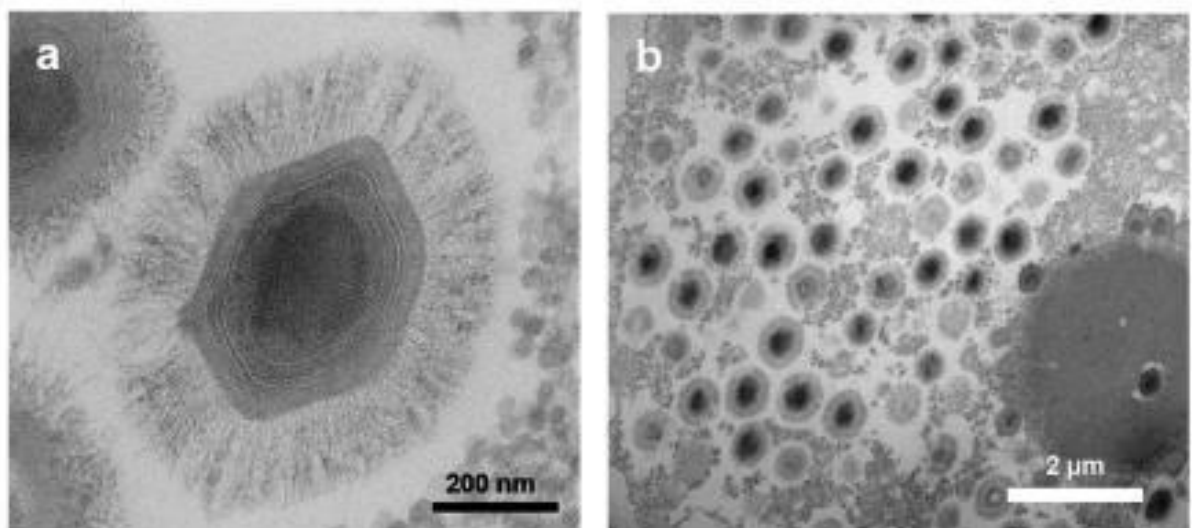


Figura 2. A) Microscopia eletrônica de transmissão de uma partícula viral de APMV evidenciando o capsídeo envolto por fibrilas; B) Célula de *Acanthamoeba polyphaga* infectada por APMV demonstrando as FV. Fonte: AHERFI *et al.*, 2016.

1.3 Características biológicas e do ciclo de multiplicação de alguns vírus gigantes isolados em *Acanthamoeba*

Após o isolamento do APMV, muitos outros vírus gigantes foram isolados em *Acanthamoeba spp.* As amebas de vida livre (AVL) pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* são protozoários cosmopolitas e ubíquos em ambientes naturais. Seu isolamento é descrito tanto de amostras de água, quanto de solo e ar (KOT *et al.*, 2018). Podem ser encontrados em reservatórios naturais e artificiais de água, bem como em amostras de poeira, ventiladores, ar-condicionado, fluidos para lentes de contato e equipamentos médicos, incluindo unidades dentárias e estações de diálise (KHEZRI *et al.*, 2016; TAWFEEK *et al.*, 2016; KRÓL-TURMINSKA *et al.*, 2017). Além disto, podem ser isoladas em materiais biológicos incluindo culturas de bactérias, lavado gástrico, líquido cérebro-espinhal, escarro, lavado broncoalveolar, nasofaringe, rins e córneas (KOT *et al.*, 2018).

Amebas são organismos anfizóicos, sendo assim tem a capacidade de existir tanto na forma de vida livre na natureza, quanto parasitária no tecido hospedeiro (KOT *et al.*, 2018). Podem ser encontrados na fase metabolicamente ativa de trofozoíto, no qual possui aproximadamente 13-40 µm. Nesta fase, apresenta um núcleo contendo um nucléolo central, vacúolos digestivos e estruturas em sua superfície denominadas pseudópodes responsáveis pelo movimento amebóide (KHAN *et al.*, 2006). Após períodos de condições ambientais ou nutricionais desfavoráveis, entram em sua fase latente de cisto. Apresentam formato arredondado de até 25 µm, envolvido por duas camadas denominadas ectocisto, localizada na parte mais externa, e endocisto localizado na parte interna do organismo. Além disso, são resistentes a condições desfavoráveis de temperatura, radiação ultravioleta, variações osmóticas e de pressão e compostos orgânicos (KOT *et al.*, 2018).

Algumas destas espécies de amebas estão relacionadas com doenças graves como encefalite amebiana granulomatosa, acantamebíase cutânea, ceratite amebiana e meningoencefalite amebiana primária (VISVESVARA, 2013). Alguns microrganismos patogênicos associados a amebas (MPAA) podem ser carregados, sendo considerados agentes causadores de pneumonia como os pertencentes aos gêneros *Legionella*, *Parachlamydia* e *Mycobacterium*, sendo capazes de resistir ao ambiente intracelular após serem fagocitados por amebas, e se multiplicar (LA SCOLA *et al.*, 2003). Com o isolamento do primeiro mimivírus em *A. polyphaga*, juntamente com a atenção atribuída às AVLs recentemente, aumentou a

importância do papel dos vírus gigantes como microrganismos associados a amebas (ABRAHÃO *et al.*, 2014).

1.3.1 Família *Mimiviridae*

Os mimivírus possuem características únicas, entre elas uma partícula que apresenta um diâmetro próximo de 750 nm (Fig. 3). O capsídeo apresenta aproximadamente 500 nm de diâmetro e é revestida por fibrilas de aproximadamente 120 nm, as quais parecem ser envoltas por compostos que se assemelham a peptidoglicanos (XIAO *et al.*, 2009). Acredita-se que elas sejam importantes nos processos de estímulo de fagocitose e agregação viral, visto que ocorre uma diminuição significativa da adesão viral às células de amebas na ausência de fibrilas (RODRIGUES *et al.*, 2015). Além disso, é possível que suas fibrilas também exerçam outras funções como aumento da resistência viral a condições externas como calor e radiação UV.

O capsídeo possui estrutura complexa, com simetria pseudo-icosaédrica devido a uma depressão central em um dos eixos denominada *star-gate*, sendo responsável pela liberação do material genético viral durante o ciclo de multiplicação (XIAO *et al.*, 2009). Em sua estrutura há uma membrana lipídica interna imersa em uma matriz fibrosa, que envolve o genoma viral. Acredita-se que algumas características da estrutura viral são decorrentes de genes adquiridos por transferência gênica horizontal (TGH), uma vez que essas características são semelhantes às encontradas em células eucarióticas, em bacteriófagos e até mesmo em algumas bactérias (XIAO *et al.*, 2009).

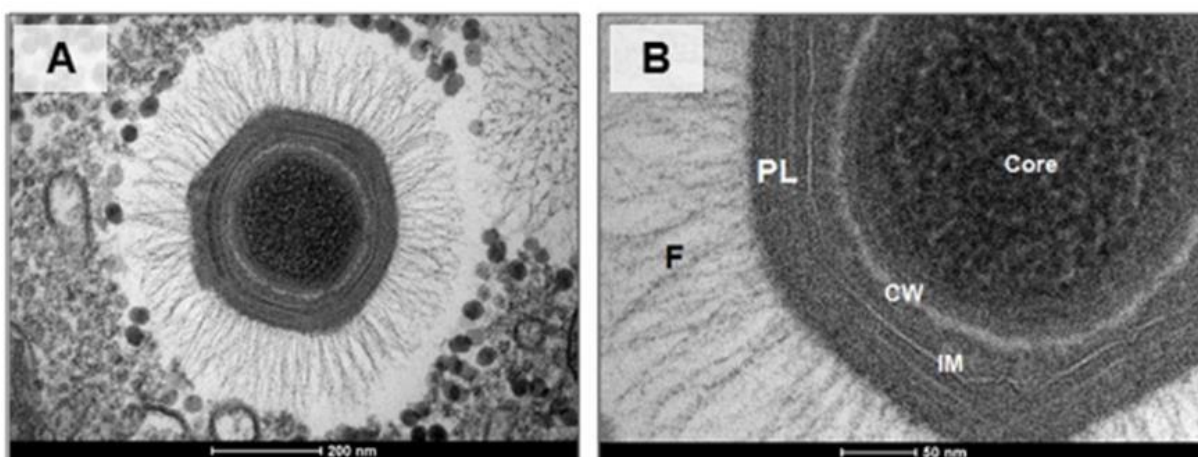


Figura 3. APMV observado através de microscopia eletrônica de transmissão. (A) partícula viral completa com o capsídeo envolto por fibrilas; (B) destaque para as estruturas presentes na partícula. F: fibrilas; PL: camadas externas do capsídeo; IM: membrana interna; CW: parede do cerne; Core: cerne. Fonte: ABRAHÃO *et al.*, 2014.

Seu genoma é constituído de uma molécula de DNA dupla fita linear com aproximadamente 1,2 Mb, e capaz de codificar cerca de 1000 proteínas, muitas ainda não caracterizadas e/ou nunca antes observadas em outros vírus (RAOULT *et al.*, 2004; LEGENDRE *et al.*, 2011). Alguns de seus genes estão relacionados ao processo de tradução, como os que codificam aminoacil-tRNA sintetases (aaRS), fatores de iniciação, elongação e terminação da cadeia polipeptídica. Tais fatores podem estar associados a uma relativa autonomia do vírus em relação aos fatores cognatos celulares durante sua multiplicação. Todavia, tal hipótese necessita ainda de confirmação experimental (COLSON *et al.*, 2013; COLSON *et al.*, 2011).

Atualmente a família *Mimiviridae* é constituída pelos gêneros *Mimivirus* e *Cafeteriavirus*. O gênero *Mimivirus* é dividido em linhagem A, na qual pertence APMV, linhagem B representada pelo *Acanthamoeba polyphaga* mouloumovirus, isolado a partir de amostras de água de torres de resfriamento de ar condicionado coletadas no sul da França (YOOSUF *et al.*, 2012), e linhagem C, representada pelo megavírus chilensis, isolado de amostras de água coletadas na costa do Chile (ARSLAN *et al.*, 2011). O gênero *Cafeteriavirus* possui um único isolado, denominado Cafeteria roenbergensis virus, que infecta o microflagelado *Cafeteria roenbergensis*, sendo identificado pela primeira vez em amostras de águas coletadas na costa do Texas na década de 1990 (FISCHER *et al.*, 2010).

Por apresentarem partículas com grandes dimensões, foi descrito que nas etapas iniciais do ciclo de multiplicação dos mimivírus ocorreria a penetração das partículas na célula hospedeira por meio de fagocitose (ANDRADE *et al.*, 2017). Após a fusão da membrana interna viral e endossomal, ocorre a abertura do *star-gate* e o genoma é liberado no citoplasma da célula. Posteriormente se estabelece uma fase de eclipse, em que as partículas virais não são visualizadas (MUTSAFI *et al.*, 2010). O ciclo multiplicação ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (Fig. 4), entretanto pode não ser um processo independente do núcleo, visto que pode haver participação de fatores nucleares importantes ao processo de replicação (MUTSAFI *et al.*, 2010; ABRAHÃO *et al.*, 2014). No interior das FV ocorre formação de proteínas constituintes do capsídeo e *star-gate*, bem como replicação e transcrição do DNA

viral, na qual ocorre de forma temporal com expressão de genes precoces, intermediários e tardios (LEGENDRE *et al.*, 2010). Uma vez que FV maduras são formadas, nas quais são divididas em diferentes zonas, se inicia o processo de morfogênese com a formação de estruturas lamelares. À medida que estas estruturas vão aumentando em complexidade, são encaminhadas para a periferia da fábrica viral onde ocorre a incorporação de genoma e aquisição de fibrilas concomitantemente. A aquisição de fibrilas parece ocorrer em uma zona menos elétron-densa da fábrica viral, denominada área de aquisição de fibrilas. Posteriormente as partículas maduras são liberadas da célula hospedeira por meio de lise celular (ANDRADE *et al.*, 2017).

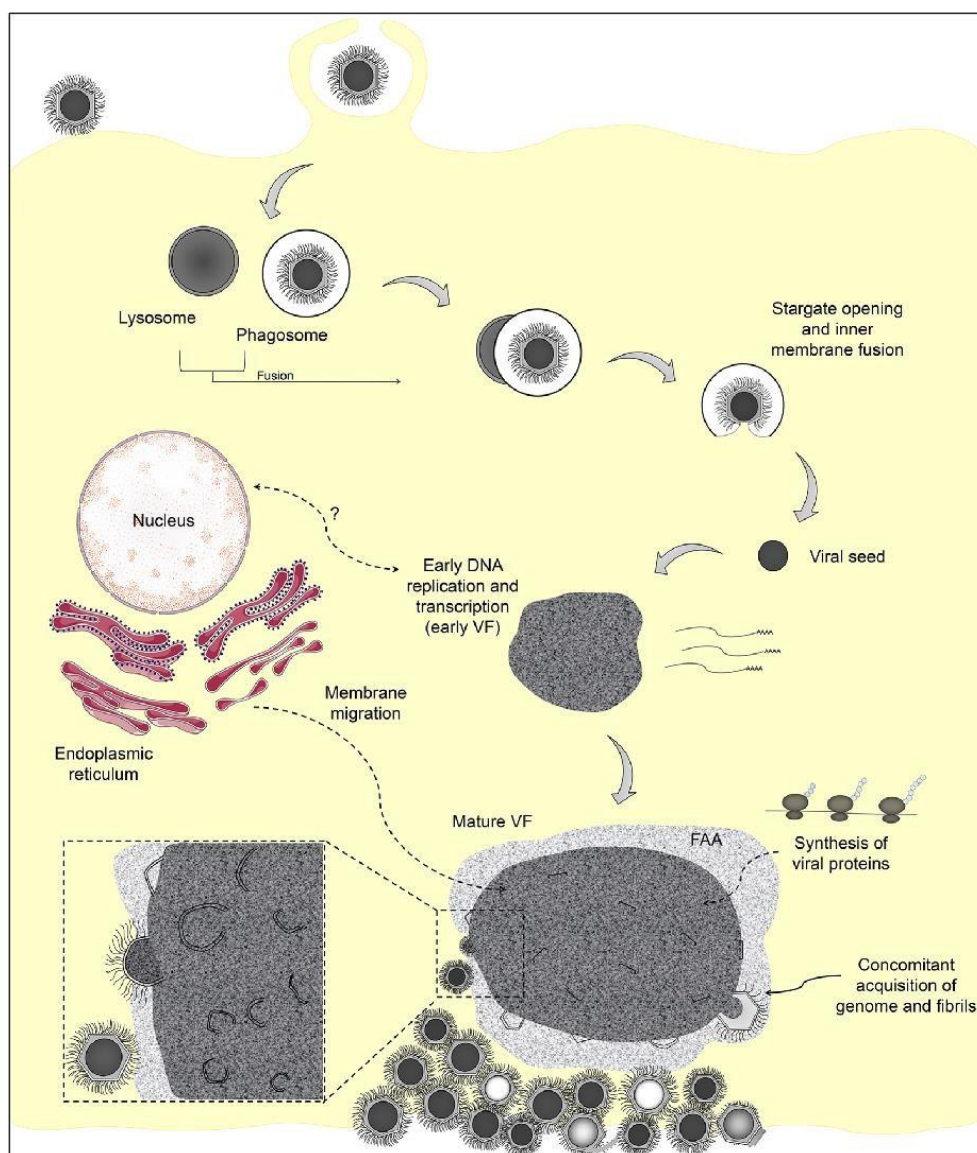


Figura 4. Esquema representativo do ciclo de multiplicação dos mimivírus, demonstrando a penetração por fagocitose e fusão das membranas viral e endossomal, abertura de *star-gate* e liberação do genoma no citoplasma da célula, replicação do genoma, formação de partículas nas FV e liberação de partículas virais maduras por lise celular. Fonte: ANDRADE *et al.*, 2017.

1.3.2 Família *Marseilleviridae*

Após o isolamento dos mimivírus, houve um aumento do interesse e uma maior busca por novos vírus gigantes, o que levou ao isolamento de novas espécies. Em 2009, a partir de amostras de águas coletadas em torres de resfriamento de ar condicionado em Paris, na França, foi isolado um novo vírus gigante em cultura de *A. polyphaga* nomeado *Marseillevirus marseillevirus* (MsV). Por apresentar características distintas dos mimivírus, possuindo capsídeo de simetria icosaédrica de aproximadamente 250 nm e um genoma completamente novo (Fig. 5), foi criada uma nova família viral denominada *Marseilleviridae* (BOYER *et al.*, 2009), a qual é dividida em linhagens A, B, C, D e E (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

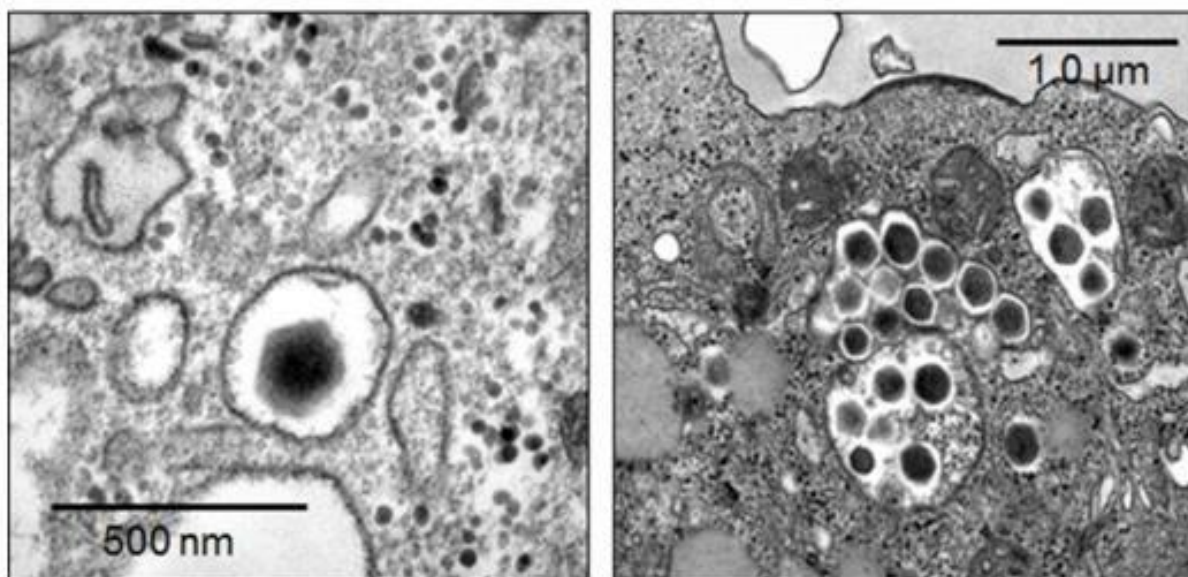


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando célula de *A. castellanii* infectada por Marseillevírus, no qual se observa uma ou mais partículas envolvidas em vesículas. Fonte: ARANTES *et al.*, 2016

O genoma dos Marseillevírus é constituído por uma molécula de DNA dupla fita circular variando entre 350-380 kbp. É capaz de codificar 455-486 proteínas, demonstrando uma alta capacidade de codificação, também observados em outros membros dos NCLDV (AHERFI *et al.*, 2014). O conteúdo de seu genoma é composto 45% por G+C e é caracterizado por apresentar considerável nível de mosaicismo, sendo muitos genes adquiridos por transferência gênica lateral (TGL) compartilhados com bactérias, vírus e eucariotos, incluindo amebas (BOYER *et al.*, 2009). Análises filogenéticas demonstraram que 11% dos genes dos Marseillevírus são similares a outros vírus gigantes, 11% similares a genes de bactérias e 19% a eucariotos (AHERFI *et al.*, 2014; THOMAS *et al.*, 2011; BOYER *et al.*, 2009).

Devido os Marseillevírus apresentarem partículas menores de 500 nm, tamanho necessário para desencadear a fagocitose, sua penetração na célula hospedeira se dá por meio de vesículas entre 300-1000 nm podendo conter até 1000 partículas. Neste caso, é observada a fusão das membranas das vesículas com a membrana da célula para liberação das partículas no citoplasma. Além disso, é sugerido que outro mecanismo de penetração destes vírus seria por meio de fagocitose de aglomerados de partículas ou por endocitose de partículas isoladas (ARANTES *et al.*, 2016). Após a fusão da membrana interna viral e endossomal ocorre a liberação do genoma no citoplasma da célula. Posteriormente, são estabelecidas FV onde se observa o recrutamento de endossomos, os quais dão origem a membrana interna viral durante a morfogênese de novas partículas (ARANTES *et al.*, 2016). Durante a síntese de novas partículas é observada a formação de estruturas semicirculares mais elétron-densas que vão se estendendo e sendo preenchidas com o conteúdo interno da partícula até a formação de partículas maduras. As partículas maduras podem ser liberadas da célula isoladamente ou envoltas por vesículas.

1.3.3 Pandoravírus

Em 2013, dois novos isolados virais apresentavam características morfológicas distintas comparados aos demais vírus gigantes isolados até o momento, possuindo partículas virais de forma oval com aproximadamente 1 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro (Fig. 6) (PHILLIPE *et al.*, 2013). Estes dois novos isolados foram denominados Pandoravirus salinus e Pandoravirus dulcis. Foram isolados a partir de amostras de sedimento coletado em um rio na costa do Chile e de água de uma lagoa em Melbourne, na Austrália respectivamente. O Pandoravirus salinus apresenta um genoma de aproximadamente 2,45 Mb, e o Pandoravirus dulcis apresenta um genoma de 1,91 Mb (PHILLIPE *et al.*, 2013). Subsequente, o terceiro vírus deste grupo foi isolado a partir de amostras de lentes de contato de um paciente com ceratite, denominado Pandoravirus inopinatum (ANTWERPEN *et al.*, 2015).

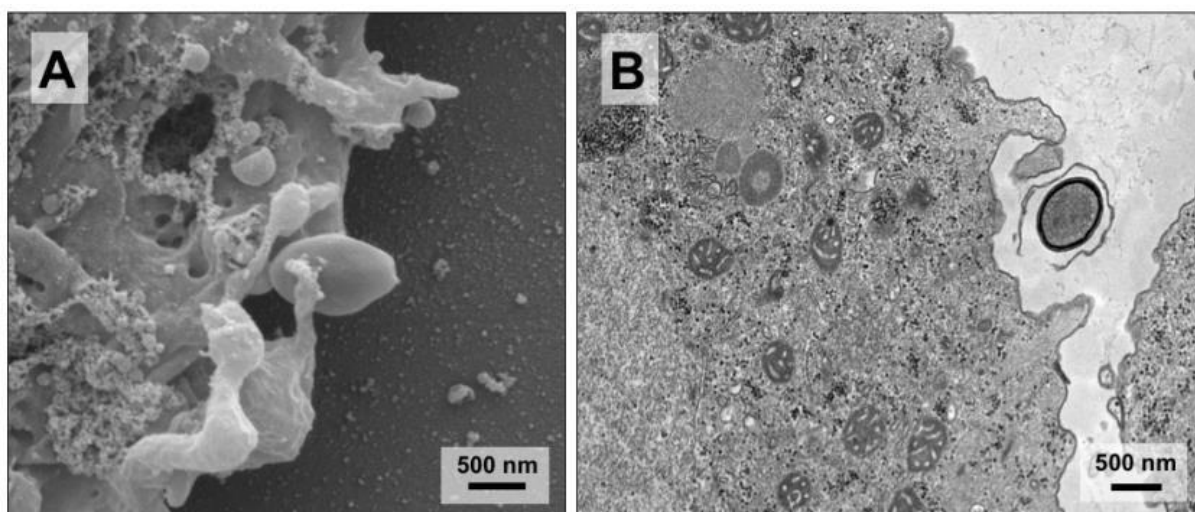


Figura 6. Microscopia de varredura (A) e de transmissão (B) mostrando células de *A. castellanii* fagocitando partículas de pandoravírus. Fonte: ANDRADE *et al.*, 2019.

Como descrito anteriormente para outros vírus gigantes, as partículas de pandoravírus penetram na célula hospedeira através de fagocitose. A partícula é transportada para o citoplasma da célula através de fagossomos que posteriormente irão se fundir com lisossomos. Desta forma, é estimulado o desnudamento das partículas de pandoravírus, e devido à abertura de um ostíolo localizado no ápice da partícula ocorre a liberação do genoma no citoplasma da célula. Posteriormente a fase de eclipse estabelecida, grandes áreas elétricas-lucentes são formadas em regiões perinucleares, denominadas FV. Ao contrário do descrito para outros vírus gigantes, o núcleo celular não permanece durante a infecção por pandoravírus (ANDRADE *et al.*, 2019).

No interior das FV é observada a síntese de novas partículas que tem início similar ao descrito para outros vírus gigantes com a formação de estruturas semicirculares elétricas-densas. Estas estruturas vão se expandindo e sendo preenchidas com seu conteúdo interno até a formação de partículas maduras. Também é descrito que a morfogênese pode ter início tanto pelo ápice da partícula, quanto por sua face oposta (ANDRADE *et al.*, 2019). Além disso, foi demonstrado através de ensaios enzimáticos e de imunofluorescência que o tegumento que constitui a ultraestrutura dos pandoravírus é composto de celulose. Posteriormente, as partículas podem ser liberadas através de lise celular ou exocitose (ANDRADE *et al.*, 2019; BELHAOUARI *et al.*, 2019).

1.3.4 Pithovírus

Apresentando morfologia semelhante a dos pandoravírus, o Pithovirus sibericum foi isolado em 2014, em culturas de *A. castellanii*, a partir de amostras de *permafrost* siberiano datado de 30.000 anos. As partículas virais medem cerca de 1,5 μm de comprimento e 0,5 μm de diâmetro (Fig. 7). A camada externa do capsídeo possui 60 nm de espessura e, ao contrário dos pandoravírus, na abertura apical apresenta uma estrutura em forma de grade hexagonal denominada cork. Apesar de apresentar partículas com grandes dimensões, seu genoma possui 610 kpb, e é constituído de dsDNA linear. É capaz de codificar 467 proteínas, e seu conteúdo de G+C é de aproximadamente 64% (LEGENDRE *et al.*, 2014).

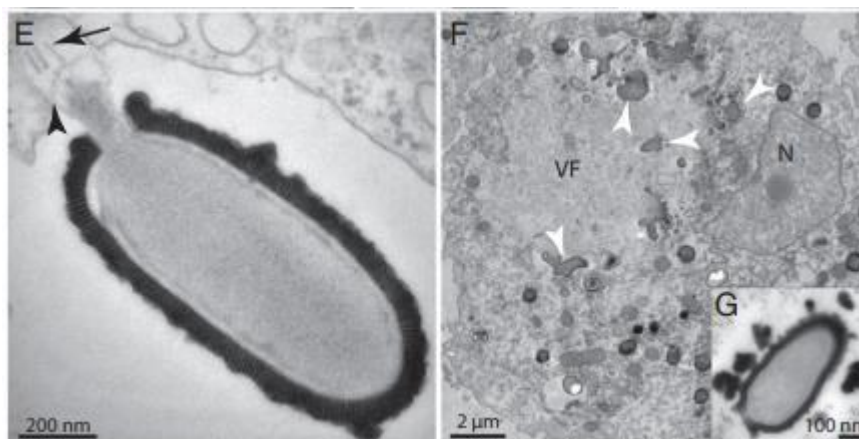


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando células de *A. castellanii* infectadas por Pithovirus sibericum, onde pode-se observar a estrutura do cork destacado com a seta preta e partículas em formação nas setas brancas. Fonte: LEGENDRE *et al.*, 2014.

Seu ciclo de multiplicação tem duração entre 10 a 20 horas. Nas fases iniciais, as partículas virais penetram na célula hospedeira por meio de fagocitose. Em seguida as partículas perdem sua estrutura apical, o que permite a fusão da membrana lipídica viral com a membrana do vacúolo, formando um canal entre o compartimento interno do vírion com o citoplasma da célula. Sendo assim, o genoma é liberado no citoplasma da célula. Ao contrário do descrito para os pandoravírus, o núcleo permanece durante toda a infecção. A síntese de novas partículas ocorre na periferia da fábrica viral, tendo início com a formação de estruturas retangulares com cork em sua face apical. Subsequente, a camada externa destas estruturas fica mais espessa assumindo a forma ovóide, e adquirem também a camada estriada de seu tegumento. Após 6-8 horas de infecção, partículas virais em diferentes estágios de maturação podem ser observadas na fábrica viral. Posteriormente as partículas virais maduras são liberadas por exocitose ou lise das células hospedeiras (LEGENDRE *et al.*, 2014).

1.3.5 Cedratvírus

Em 2016, foi isolado um novo vírus gigante geneticamente semelhante aos pithovírus, a partir de amostras coletadas na Argélia. O cedratvírus, assim denominado, possui partículas virais que medem cerca de 1.2 μm de comprimento e 0,5 μm de diâmetro (Fig. 8), apresentando forma oval e poros apicais nas duas extremidades das partículas, o que os diferencia dos pithovírus (ANDREANI *et al.*, 2016). O genoma do Cedratvirus A11 é constituído por uma molécula de DNAcircular de dupla fita, com aproximadamente 589.068 pb, no qual é composto por 42,6% de C+G, e codifica 574 proteínas preditas. Dos genes preditos, 69,2% possuem sequências homólogas no *GenBank* e 30,8% são definidas como ORFans, por não possuírem similaridade significativa com qualquer gene conhecido (ANDREANI *et al.*, 2016).

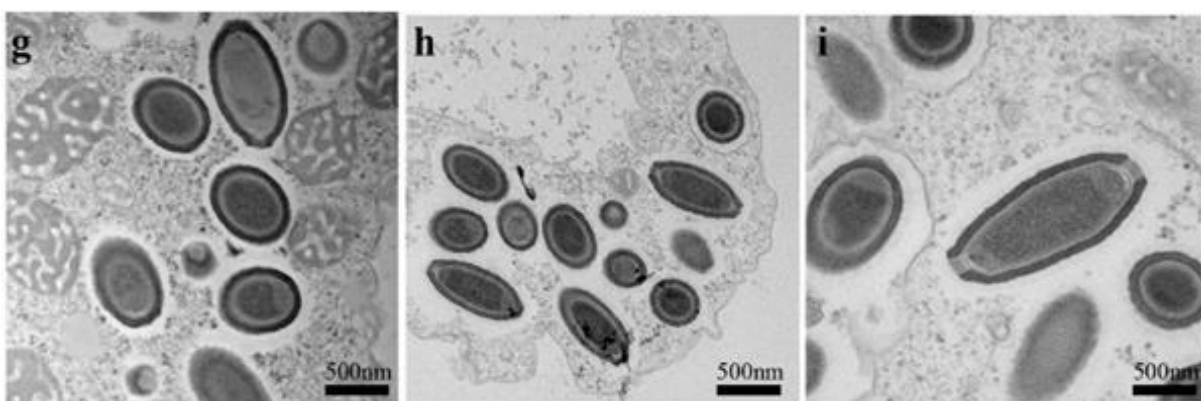


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de células de *A. castellanii* infectadas com cedratvírus A11, no qual se observam partículas maduras acumuladas no citoplasma da célula. Fonte: ANDREANI *et al.*, 2016.

Devido à existência de lacunas acerca das etapas do ciclo de multiplicação dos cedratvírus, foram realizados ensaios com inibidores de fagocitose e microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. Desta forma, foi demonstrado que nas etapas iniciais as partículas são internalizadas pela célula hospedeira por meio de fagocitose. Posteriormente ao desnudamento da partícula que ocorre devido à abertura dos poros de suas extremidades, o genoma é liberado no citoplasma da célula. A partir disso, grandes áreas elétron-lucentes são formadas em regiões perinucleares denominadas FV, onde ocorre a morfogênese. Nesta região foi observado um intenso recrutamento de membranas, as quais são importantes na etapa de síntese de novas partículas (SILVA *et al.*, 2018).

A morfogênese pode ocorrer tanto na periferia, quanto no interior das FV, e tem início com a formação de estruturas semicirculares elétron-densas denominadas crescentes virais. Estas estruturas se expandem e são preenchidas com seu conteúdo interno. Nesta fase as

partículas apresentam formato de retângulos e somente um poro é observado. Após seu completo fechamento, os poros das duas extremidades são formados, e com o espessamento da parede interna as partículas assumem formato ovóide. Nas etapas finais do ciclo de multiplicação as partículas maduras são liberadas por exocitose ou por lise celular (Fig. 9) (SILVA *et al.*, 2018).

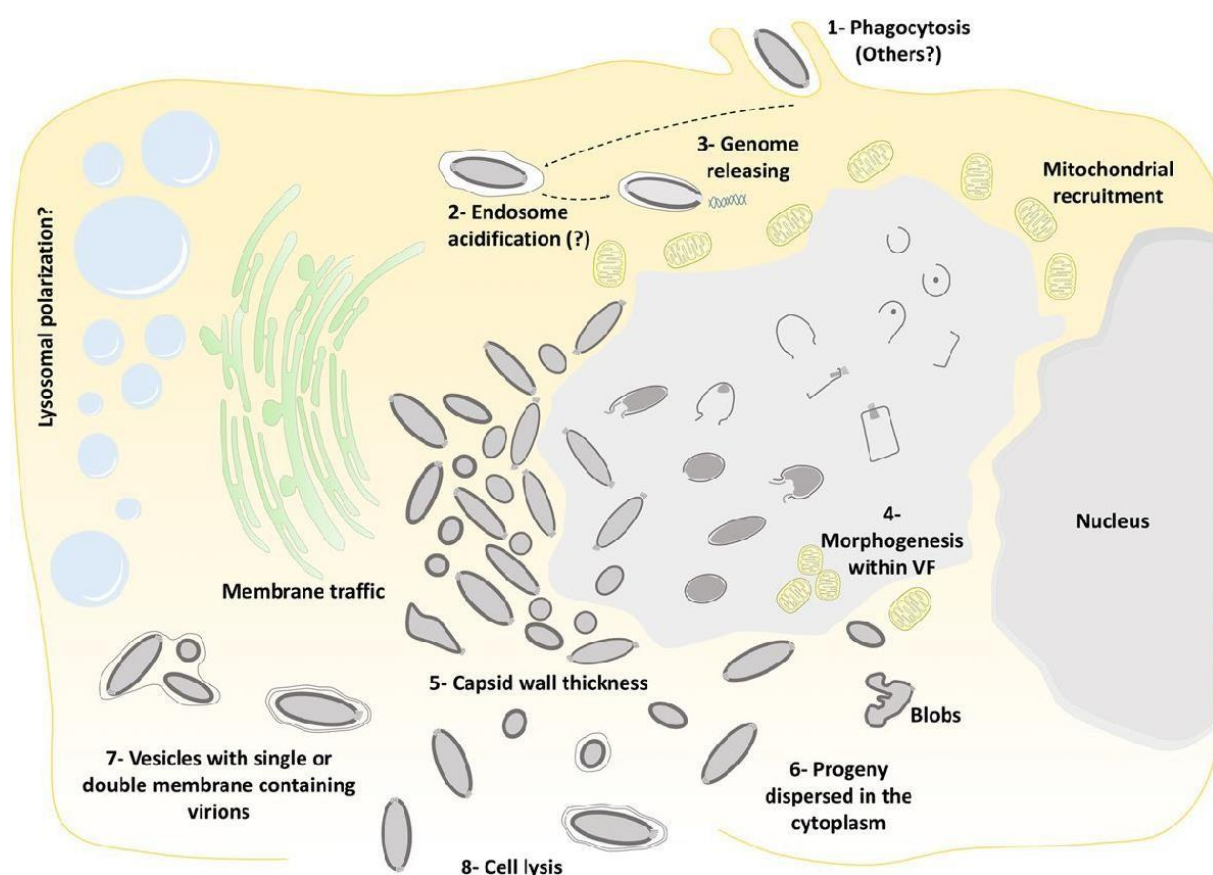


Figura 9. Esquema do ciclo de multiplicação dos cedratvírus evidenciando partículas sendo fagocitadas, desnudamento e liberação do genoma no citoplasma da célula, síntese de novas partículas no interior e na periferia das FV e liberação das partículas por lise celular e exocitose. Fonte: SILVA *et al.*, 2018.

1.4 Características biológicas e do ciclo de multiplicação de vírus gigantes isolados em *Vermamoeba vermiformis*

A utilização de diferentes espécies de amebas tem contribuído para o aumento da identificação de novos vírus gigantes. Desta forma, estudos têm descrito o isolamento de novos vírus utilizando como modelo celular *Vermamoeba vermiformis* (RETENO *et al.*, 2015; BAJRAI *et al.*, 2016). Sua distribuição é relatada em diversos países sendo recuperadas tanto de ambientes artificiais, quanto de ambientes naturais (Fig. 10). São isoladas principalmente

em ambientes aquáticos como água de torneira, fontes, piscinas e águas superficiais, bem como em águas utilizadas para consumo, esgoto e plantas de tratamento de água. Também podem ser encontradas em ambientes hospitalares, sendo em alguns estudos mais isoladas comparado as espécies *Acanthamoeba* (ROHR *et al.*, 1998; PAGNIER *et al.*, 2015; OVRUTSKY *et al.*, 2013). Além disso, foi descrito seu isolamento em lentes de contato, amostras de biópsia de córnea e de pacientes com ceratite (DELAFONT *et al.*, 2018). *V. vermiformis* são raramente responsáveis por doenças em humanos, porém alguns casos de ceratite e danos à córnea são reportados (AITKEN *et al.*, 1996; ABEDKHOJASTEH *et al.*, 2013).

Assim como descrito para outras AVL, a *V. vermiformis* também pode ser reservatório ou veículo de diversos microrganismos patogênicos como *Legionella*, *Mycobacterium* e *Clamídia*. Desta forma, contribuem para a regulação das comunidades microbianas, mantendo o tamanho da população, promovendo a diversidade de espécies de microrganismos e sustentando o fluxo de energia e matéria através das redes alimentares (DELAFONT *et al.*, 2018).

Apresentam trofozoítos de morfologia alongada com vacúolos em seu citoplasma, e uma zona hialina anterior que indica a direção de sua locomoção. Apresentam também duas fases em seu ciclo de vida, sendo trofozoíto metabolicamente ativa, e a fase de cisto de latência. Seus cistos tem aproximadamente 6 μm e apresentam formato arredondado. Assim como descrito para *Acanthamoeba*, os cistos são constituídos de duas camadas denominadas ectocisto e endocisto com 50 e 140 nm de espessura, respectivamente. Estes são caracterizados por apresentar resistência a condições desfavoráveis de temperatura, pH e mudanças de osmolaridade (DELAFONT *et al.*, 2018).

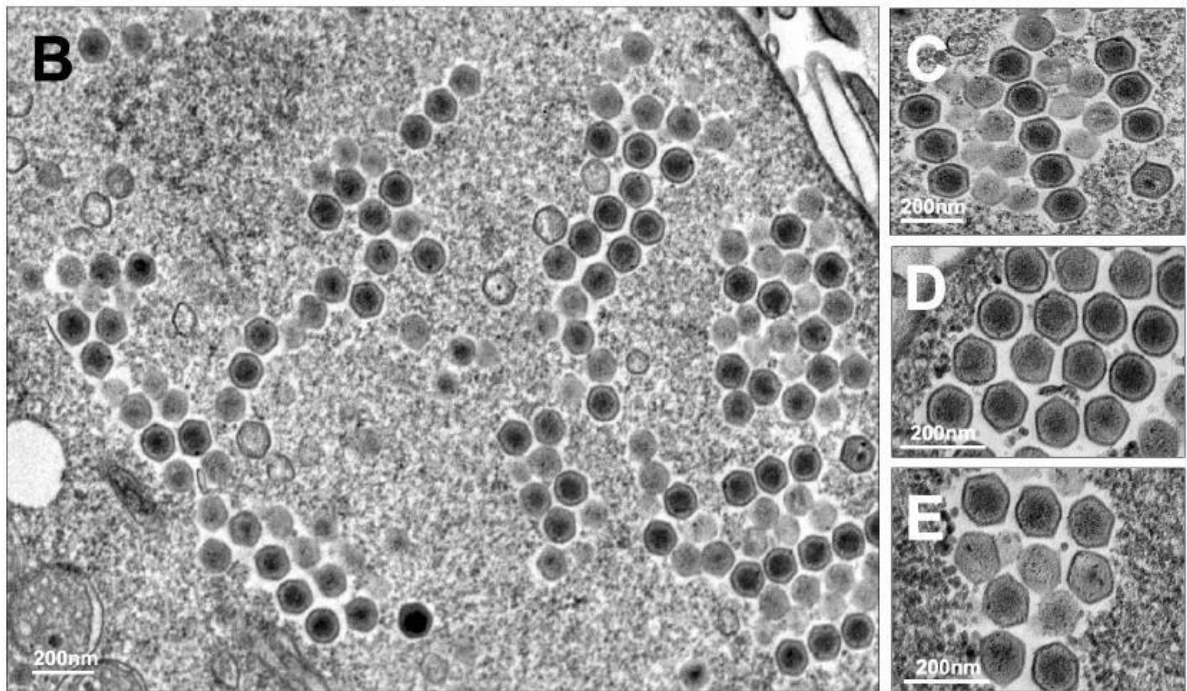


Figura 11. Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando infecção de *Vermamoeba vermiformis* por *Faustovirus mariensis*, onde são observadas partículas em diferentes estágios de maturação durante a morfogenese no citoplasma da célula, bem como agrupadas em formato de colmeia. Fonte: BORGES *et al.*, 2019.

O ciclo de multiplicação do Faustovírus tem duração de 18-20 horas, tendo início com a internalização das partículas virais, as quais podem ser detectadas nos fagossomos do hospedeiro 2-4 horas após a infecção (RETENO *et al.*, 2015). Posteriormente ocorre a fusão das membranas lipídicas virais e do vacúolo para liberação do genoma no citoplasma da célula. Em seguida são formadas FV elétron- lucentes, nas quais se observa intenso recrutamento de membranas e mitocôndrias. Estas se localizam em regiões perinucleares, e em seu interior ocorre a síntese de novas partículas. Assim como observado para outros vírus gigantes, a morfogênese tem início com a formação de estruturas semicirculares elétron-densas, que se estendem e são preenchidas com seu conteúdo interno até a formação de partículas maduras (BORGES *et al.*, 2019). Em estudo recente algumas partículas foram observadas no interior do núcleo celular, porém mais estudos são necessários para elucidação deste achado (BORGES *et al.*, 2019).

Além disso, também foi descrito em fases posteriores do ciclo de multiplicação do Faustovírus, que após a formação de partículas maduras estas se organizam no citoplasma em forma de colméia. Ao contrário do descrito para mimivírus e pandoravírus, exocitose não foi observada como forma de liberação das partículas, sendo lise celular a principal estratégia de

liberação descrita até o momento (BORGES *et al.*, 2019).

1.4.2 Kaumobavírus

O segundo vírus gigante isolado em *V. vermiformis* foi o kaumobavírus, a partir de amostras de esgoto coletadas na cidade de Jeddah, na Arábia Saudita. Este vírus apresenta um capsídeo de simetria icosaédrica de 250 nm de diâmetro, dispondo de estrutura semelhante a observada anteriormente no faustovírus (Fig.12) (BAJRAI *et al.*, 2016). O genoma do kaumobavírus é composto de uma molécula de DNA dupla fita na forma circular com 350.731 pb, sendo 43,7% composto de C+G. Codifica 465 proteínas preditas contendo de 113 a 6.209 nucleotídeos, representando uma capacidade de codificação de 86%. De acordo com análises filogenéticas, 59% dos genes preditos são similares aos encontrados em outros vírus gigantes, principalmente faustovírus e asfarvírus, 15% com genes presentes em bactérias e 25% com genes presentes em eucariotos (BAJRAI *et al.*, 2016).

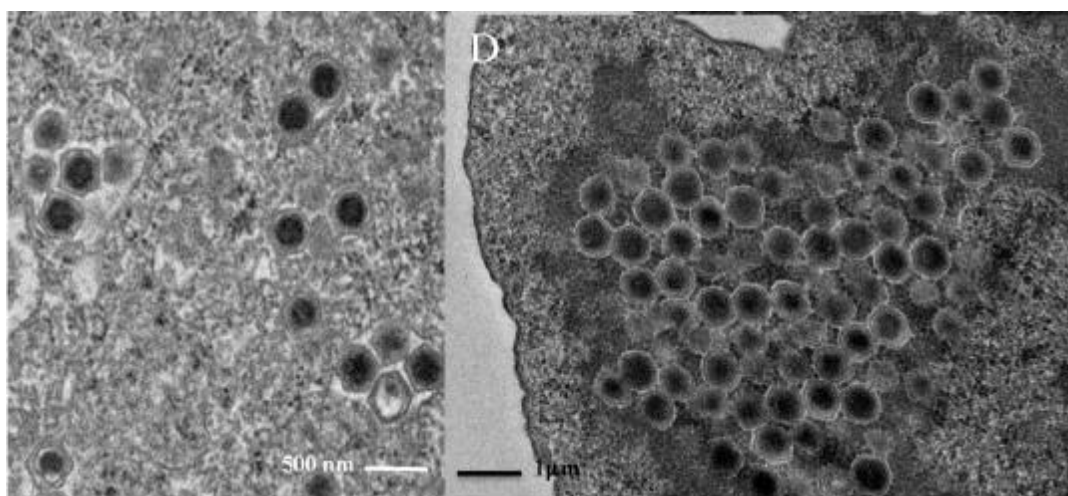


Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão em que se observa células de *V. vermiformis* infectadas com kaumobavírus, onde se observam partículas no citoplasma celular em estágios mais precoces de infecção e em estágios finais acumulando-se no citoplasma da célula. Fonte: BAJRAI *et al.*, 2016.

O ciclo de multiplicação tem duração de cerca de 20 horas. Similar a outros vírus gigantes, inicia pela penetração através da fagocitose. Após fagocitose duas ou mais partículas são observadas no interior de vacúolos. Posteriormente ao desnudamento, ocorre uma fase de eclipse em que não são observadas partículas no citoplasma da célula. Cerca de seis horas após infecção, FV são observadas no citoplasma da célula onde ocorre a morfogênese. As partículas maduras se acumulam no citoplasma da célula hospedeira e sua liberação ocorre através de lise celular. Devido ao fato de ter somente um isolado, pouca informação se tem tanto da dispersão

do kaumoebavírus no ambiente, quanto de seu ciclo de multiplicação. Desta forma, ainda são necessários mais estudos com objetivo de elucidar e aprofundar o conhecimento sobre as etapas do ciclo de multiplicação (BAJRAI *et al.*, 2016).

1.4.3 Tupanvírus

Como descrito em estudos anteriores, o tupanvírus foi isolado tanto em cultura de *A. castellanii*, quanto de *V. vermiformis* (ABRAHÃO *et al.*, 2018). Desta forma, seu ciclo de multiplicação foi investigado profundamente em ambas as plataformas celulares. Sendo assim, mediante análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, foi observado que os tupanvírus penetram nas células hospedeiras através de fagocitose. Após a fagocitose, uma ou mais partículas são visualizadas no interior de fagossomos. Com a abertura do *star-gate*, e fusão da membrana interna viral e do fagossomo, o genoma é liberado no citoplasma celular (SILVA *et al.*, 2019).

Diferentemente do que foi observado em *A. castellanii*, as FV formadas mediante a infecção de tupanvírus em *V. vermiformis* apresentam bordas mais delimitadas e irregulares, além de serem mais elétrons-densas (Fig. 13). Assim como observado para outros vírus gigantes, a morfogênese ocorre no interior das FV também tendo início com a formação de crescentes. Em estágio mais avançados do ciclo de multiplicação são visualizadas partículas ainda não totalmente maduras e na periferia das FV partículas já com calda, fibrilas e genoma incorporado. Estas etapas de montagem da partícula podem acontecer concomitantemente, não havendo uma ordem cronológica para que ocorram. Ao contrário do observado para outros vírus pertencentes à família *Mimiviridae*, não é observada uma zona de aquisição de fibrila nas FV de Tupanvírus. Ao final do ciclo de multiplicação é observado o acúmulo de partículas no citoplasma da célula, as quais são liberadas mediante lise celular em ambas as plataformas. Porém, em *V. vermiformis* é descrito uma quantidade maior de partículas defectivas, com tamanhos muito acima do normal, caracterizadas como “super-tupanvirus” (SILVA *et al.*, 2019).

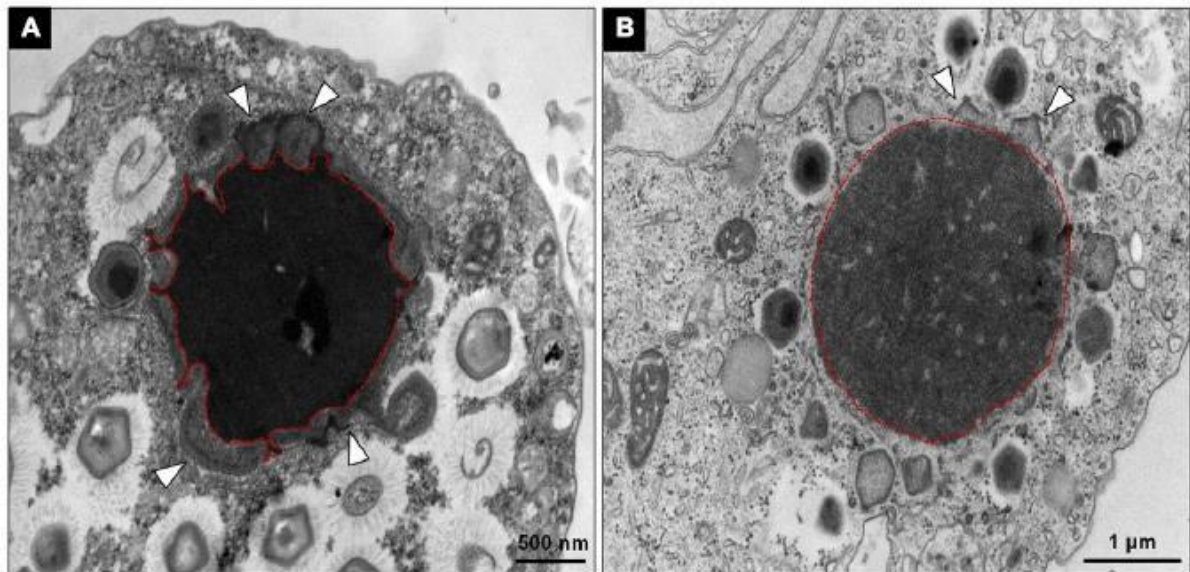


Figura 13. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando FV de tupanvírus em *V. vermiformis* e *A. castellanii*, onde observamos na figura A a formação de fábrica viral mais elétron densa com a formação de partículas em sua periferia destacadas pelas setas brancas. E na figura B a formação de uma fábrica viram mais elétron luscente, também apresentando partículas em sua periferia destacadas pelas setas brancas. Fonte: SILVA *et al.*, 2019.

1.4.4 Yasminevírus

Recentemente, em 2019 foi isolado o primeiro vírus pertencente ao grupo dos klosneuvírus em *V. vermiformis*, denominado Yasminevírus. Este foi recuperado a partir de amostras de esgoto coletadas na cidade de Jeddah, na Arábia Saudita. Seu capsídeo apresenta simetria icosaédrica de cerca de 330 nm e seu genoma é constituído de dsDNA com cerca de 2.126.343 pb capaz de codificar 1541 proteínas preditas (Fig. 14). Dentre estas, 518 (33,6%) têm função conhecida e 1023 (66,4%) são proteínas hipotéticas. Além disso, o Yasminevírus possui, assim como os tupanvírus, diversos componentes do aparato de tradução protéica. Sendo assim, apresenta 70 tRNA, 20 aaRSs, além de alguns fatores de tradução e elongação da cadeia polipeptídica. Aproximadamente 44,4% de seu genoma é composto por ORFans, 34,6% apresenta similaridade com outros vírus, 13,2% com eucariotos e 7,2% com bactérias. Dentre os genes que apresentaram similaridade com outros vírus, 87,9% eram com klosneuvírus (BAJRAI *et al.*, 2019).

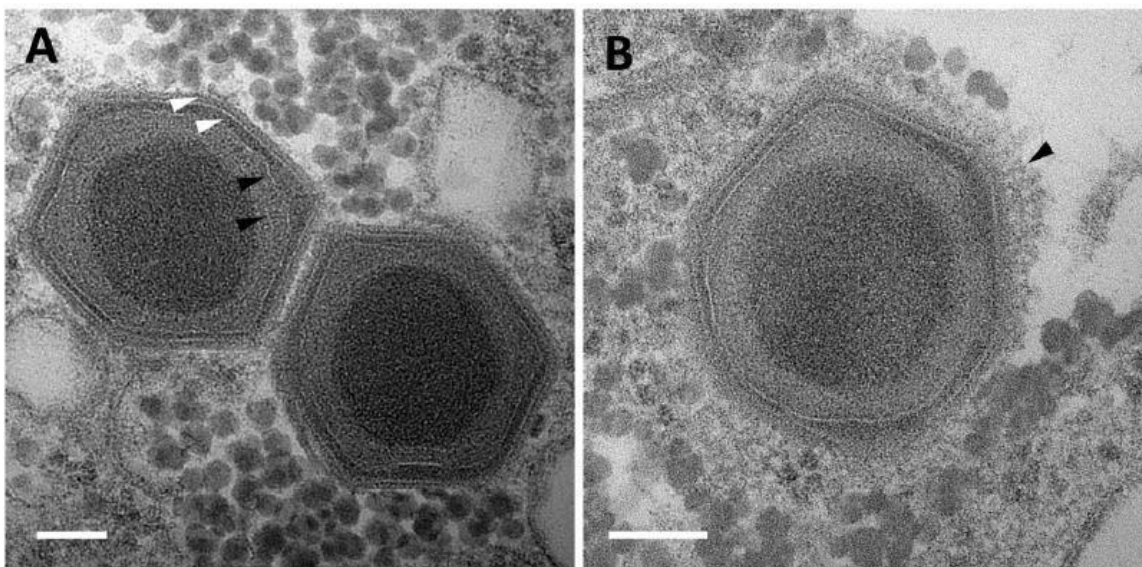


Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando partículas de Yasminevirus, no qual apresenta partículas icosaédricas com diversas camadas destacadas pelas setas brancas e pretas. Fonte: BAJRAI *et al.*, 2019.

Seu ciclo de multiplicação se inicia através da adesão das partículas a membrana celular. Devido ao tamanho das partículas sua internalização através de fagocitose necessita de mais investigação, visto que outros vírus de ameba menores como os *Marseillevirus* exploram endocitose como via de penetração. Após 30 minutos de infecção, partículas virais são observadas no interior de fagossomos e após seu genoma é liberado no citoplasma celular. Foi observado que após a fase de eclipse estabelecida o núcleo celular muda de conformação, o que indica que o Yasminevirus manipularia o núcleo da célula hospedeira para desencadeamento da expressão de seu genoma. Porém, mais estudos são necessários para confirmação. Subsequente, FV maduras elétron-densas são formadas na periferia do núcleo da célula hospedeira. No interior das FV novas partículas são sintetizadas, e nas etapas finais do ciclo de multiplicação se acumulam no citoplasma celular e são liberadas através de lise (BAJRAI *et al.*, 2019).

1.4.5 Orpheovírus

Em 2018, o Orpheovírus IHUMI-LCC2 foi isolado a partir de amostras de fezes de rato coletadas na França. Diferentemente dos outros vírus isolados em *V. vermiformis*, o orpheovírus apresenta partículas de formato ovóide com ostíolo em seu ápice, similar aos pandoravírus e pithovírus (Fig. 15). As partículas variam entre 900-1.100 nm de comprimento e 500 nm de diâmetro. Seu genoma é dsDNA circular, e possui cerca de 1.473.573 pb constituído de 1.512 genes preditos. Dentre estes, 57,5% são ORFans, 12,3% são similares com outros vírus, 14,7%

com eucariotos e 15,3% com procariotos. Seu ciclo de multiplicação tem duração de 20 horas tendo início com a internalização das partículas através de fagocitose. Posteriormente o genoma é liberado no citoplasma da célula e ocorre a formação de FV.

No interior das FV novas partículas são sintetizadas, e após seu acúmulo no citoplasma celular são liberadas por exocitose (ANDREANI et al., 2018). Além de muitas etapas do ciclo de multiplicação do orpheovírus ainda não estarem bem elucidadas, sua dispersão no ambiente e interação com hospedeiro também são pouco conhecidas. Devido ao fato de somente ter um isolado deste grupo até o início deste trabalho, pouca informação se tem acerca deste vírus. Desta forma, mais estudos são necessários para compreender melhor as características biológicas deste novo grupo de vírus.

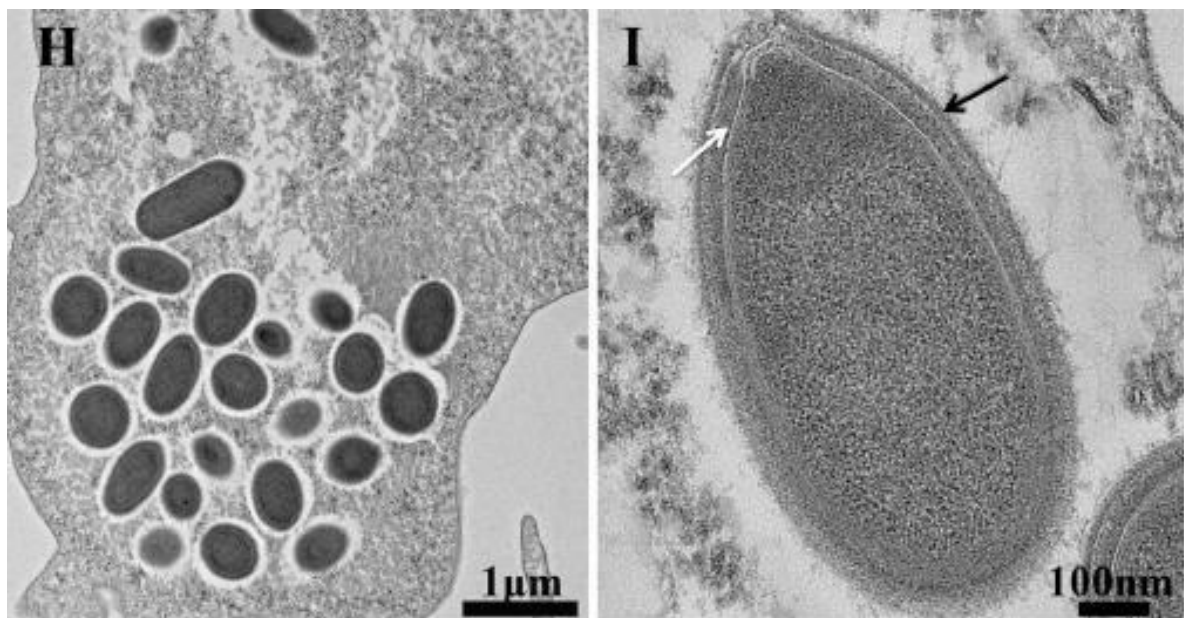


Figura 15. Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando partículas de orpheovírus. Na figura A observa-se o acúmulo de partículas no citoplasma celular em estágios finais de infecção, e na figuraB um partícula madura onde são destacadas pelas setas branca e pretas a presença de camadas interna e externa. Fonte: ANDREANI *et al.*, 2018.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar as diferentes etapas do ciclo de multiplicação do Orpheovírus IHUMI-LCC2 em *V. vermiformis*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o efeito citopático causado pelo orpheovírus em *V. vermiformis*;
- Caracterizar o ciclo de multiplicação do orpheovírus através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
- Analisar o ciclo de multiplicação do orpheovírus por meio de ensaio de imunofluorescência;
- Investigar a exocitose como mecanismo de liberação de partículas de orpheovírus através de ensaios de contagem de partículas por microscopia óptica;
- Investigar o impacto de inibidores de tráfico de membranas durante o ciclo de multiplicação do orpheovírus;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meio para cultivo celular PYG (Peptona/ Extrato de levedura/ Glicose)

Para a manutenção de amebas pertencentes à espécie *V. vermiformis*, foi utilizado o meio de cultura PYG (protease peptona, extrato de levedura e glicose). Este meio é comumente usado em cultivo de amebas de vida livre, o qual é composto para cada um litro de meio: 8 μ M de sulfato de magnésio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha), 0,5 μ M de cloreto de cálcio (CaCl_2) (Merck, Alemanha), 5,0 nM de sulfato de ferro amoniacal hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha), 1,4 mM de fosfato dibásico de sódio hepta hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha), 2,5 mM de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) (Merck, Alemanha), 3,4 mM de citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Alemanha), 20 g de extrato bactopectona (Merck, Alemanha), 2,0 g de extrato de levedura (BD, França), 0,05 M de glicose (Merck, Alemanha) e água destilada.

Após a homogeneização de seus componentes, o pH do meio é ajustado para 6,5 e este é então autoclavado por 15 minutos a 121°C. O meio então é resfriado em temperatura ambiente e submetido a uma filtração em membranas de 0,22 μ m (Millipore, EUA) para retirada de eventuais cristais que se formam durante a sua produção e causam danos em cultura de amebas.

Posteriormente, o meio é armazenado em câmara fria (temperatura de 4 a 8°C) até que este possa ser utilizado. Para isso, de forma paralela, o meio deve passar por um teste de esterilidade no qual 1 mL de PYG é incubado com 9 mL de solução tioglicolato, por 7 dias a 37°C. Não ocorrendo a contaminação do meio durante esse prazo, este está pronto para uso após sua suplementação com 200 U/mL de Penicilina (Cristália, Brasil), 50 µg/mL de Estreptomicina (Sigma, EUA) e 2,5 µg/mL de Anfotericina B (Sigma, EUA).

3.2 *Vermamoeba vermiformis* (ATCC CDC19)

As células da espécie *V. vermiformis* utilizadas neste trabalho são provenientes da American Type Culture Collection (ATCC CDC19) (Maryland, EUA). Estas foram gentilmente cedidas pelo Professor Bernard La Scola da Aix-Marseille Université, da França. As amebas foram cultivadas em meio PYG suplementado com 0,14 mg/mL Penicilina (Sigma-Aldrich, USA), 50 mg/mL Gentamicina (Thermo Fisher Scientific, USA) e 2.5 mg/mL anfotericina (Bristol-Myers Squibb, USA). As células foram mantidas em estufa a 32°C em garrafas de 75 cm² (Kasvi, Brasil). Os subcultivos foram realizados três vezes por semana ou de acordo com a necessidade. As culturas foram utilizadas neste trabalho como plataforma para multiplicação de vírus gigantes, análises de microscopia eletrônica de transmissão, varredura e de imunofluorescência, bem como em ensaios com inibidor, curva de ciclo único e titulação de amostras virais.

3.3 Vírus

O isolado Orpheovirus IHUMI-LCC2 utilizado neste estudo foi recuperado a partir de amostras de fezes de rato coletadas na cidade de Marseille, na França em trabalhos anteriores (ANDREANI *et al.*, 2018). Este foi gentilmente cedido pelo Professor Bernard La Scola da Aix-Marseille Université, da França.

3.4 Propagação viral

Para a propagação dos estoques virais, orpheovírus foi inoculado na multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 em garrafas de 175 cm² (Nunc™ Cell Culture Treated Flasks, Thermo Fischer Scientific, USA) contendo cerca de 3×10^7 células de *V. vermiformis*, em meio PYG. Após 4 dias de incubação a 32°C e observação de efeito citopático e lise completa das células em cultura, o conteúdo foi coletado e posteriormente centrifugado a 12.000 x g durante

10 minutos para remoção de debris celulares. Subsequentemente o sobrenadante foi vagarosamente gotejado sobre 10 mL de uma solução de sacarose 40% (Sigma-Aldrich, EUA) em tubos para ultracentrifugação. Os tubos foram então submetidos a um processo de ultracentrifugação a 36,000 x g por 1 hora, a 4°C em ultra centrífuga Combi Sorvall, buscando a sedimentação das partículas. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de PBS. Alíquotas das amostras virais foram feitas, devidamente identificadas e estocadas a -20°C até serem posteriormente tituladas.

3.5 Titulação viral

Para estimativa do título viral, foi utilizado o método de diluição limitante, descrito por Reed-Muench (Reed e Mench, 1938). Para isso, foram utilizadas placas de 96 poços (Corning, NY, EUA) contendo 100 µL de meio PYG e aproximadamente 80.000 amebas/poço. Após se atingir uma confluência celular de cerca de 80%, as amostras virais a serem tituladas são diluídas em PBS de maneira seriada, em uma razão de 1:10 (10^{-1} a 10^{-11}), e em seguida, um total de 100 µL de cada diluição é adicionado em oito poços. Além disso, em oito poços é realizado um controle de viabilidade de amebas, sendo neste adicionados 100 µL de PBS. As placas são vedadas completamente e incubadas a 32°C. Cada poço passa então a ser monitorado diariamente para observação de efeito citopático, e após 4 dias de incubação, o cálculo do título viral é realizado com o valor expresso em TCID₅₀/mL.

3.6 Ensaios de caracterização de efeito citopático, curva de ciclo único e contagem de partículas

Para caracterização do efeito citopático (ECP) desencadeado pela Orpheovirus em células de *V. vermiformis* por microscopia óptica, garrafas de cultura celular de 25 cm² (Nunc™ Cell Culture Treated Flasks, Thermo Fischer Scientific, USA) contendo 3×10^6 células de *V. vermiformis* foram infectadas com Orpheovirus em um M.O.I. de 10, incubados a 32°C e observados em diferentes horas após a infecção (h.p.i) (1, 3, 6, 9, 12 e 24 h.p.i) por microscopia óptica (Olympus BX41, Japão) e obtidas imagens de cada tempo de infecção. Células não infectadas de *V. vermiformis* (controle) também foram observadas.

Além disto, para investigação do perfil de multiplicação do orpheovírus ao longo de seu ciclo de multiplicação, foi realizada uma curva de ciclo único usando frascos de 25 cm² em duplicata contendo 3×10^5 células de *V. vermiformis*. Após 30 minutos de infecção em uma

M.O.I. de 10, as células foram lavadas com PBS e posteriormente foi adicionado 5 mL de meio PYG.

Em diferentes momentos (1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 hpi), as células infectadas e os sobrenadantes foram coletados e titulados usando método descrito anteriormente. Os sobrenadantes coletados também foram utilizados para extração de DNA viral pelo kit (Roche) e submetidos a uma reação em cadeia da polimerase (qPCR) para quantificar a carga do genoma viral direcionada ao gene da DNA polimerase. Para amplificação foram utilizados os iniciadores Forward 5'- ATGGCGAAATATGCGGAAGGG-3' e Reverse 5'- TCTTGTGCTCCTAACGCACC-3'.

Para esse processo foi utilizado 1 µL de cada amostra (com uma quantidade variando entre 200 — 300 ng de DNA), kit comercial SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 4 mM de cada iniciador e água de injeção em quantidades adequadas, de maneira a totalizar 10 µL de reação. Todas as reações foram realizadas em placas 48 poços, em duplicata. Os ciclos térmicos utilizados na amplificação das amostras foram estabelecidos de acordo com o padrão do programa da máquina StepOne (Applied Biosystems, EUA), sendo um ciclo a 95°C por 10 min e 40 ciclos a 95°C por 10 s e 60°C por 40 s; 95°C por 15 s, 58°C por 15 s e um ciclo final a 95°C por 15 s foi concluído.

Para confirmação de que as partículas de orpheovírus seriam liberadas da célula hospedeira através de exocitose foram realizados ensaios de contagem de partículas em diferentes tempos de infecção. Para isso, 3×10^5 células de *V. vermiformis* com orpheovírus em uma M.O.I. de 5 em garrafas de cultura celular de 25 cm² (Nunc™ Cell Culture Treated Flasks, Thermo Fischer Scientific, USA). Análises foram realizadas nos tempos de infecção de 3, 6, 9, 12 e 24 h.p.i. Trinta minutos após a infecção, a monocamada de células foi lavada uma vez com PBS e adicionado 5 mL de meio PYG. Após cada tempo de infecção, foi coletado 12 µL do sobrenadante para contar o número de partículas de liberadas durante cada tempo de infecção. As partículas foram observadas por microscopia óptica (Olympus BX41, Japão) sob ampliação de 1000x usando uma câmara de contagem de células (Kcell Olen Kasvi, Brasil).

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET), 3×10^7 células de *V. vermiformis* cultivadas em garrafas de 175 cm² (Kasvi, Brasil) foram infectadas em um M.O.I. de 0,01. Após observado ECP, o conteúdo foi centrifugado durante 10 min à 800 x g. O sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfatado de sódio 0,1 M (pH 7,4) e fixado com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por pelo menos 2 h à temperatura ambiente. O sedimento foi então lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 0,1 M e suspenso na mesma solução. Depois, as amebas foram embebidas em resina EPON usando um método padrão a seguir: 2 h de fixação em tetróxido de ósmio a 2%, cinco lavagens em água destilada, incubação overnight em acetato de uranila a 2% a 2-8 °C, duas lavagens em água destilada, 10 min de desidratação em concentrações crescentes de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%), 20 minutos de incubação em acetona e incorporação em resina EPON. Secções ultrafinas foram posteriormente analisadas sob MET (Spirit Biotwin FEI-120 kV) no Centro de Microscopia da UFMG, Brasil.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV), 3×10^6 células de *V. vermiformis* são infectadas em um M.O.I. de 0,01, e após 1 mL desta suspensão é centrifugada. Posteriormente, 10 µl do *pellet* formado foram adicionados às lâminas de vidro redondas cobertas por poli-L-lisina e fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 2 h à temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas três vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1 % por 1 h à temperatura ambiente. Após uma segunda fixação, as amostras foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e imersas em ácido tânico 0,1% por 20 min. As amostras foram então lavadas em tampão cacodilato e desidratadas por passagens seriadas em soluções de etanol com concentrações variando de 35 a 100%. Eles foram secos em ponto crítico usando CO₂, transferidos para suportes metálicos (*stubs*) e metalizados com uma camada de ouro de 5 nm. As análises foram concluídas através de um MEV (FEG Quanta 200 FEI) no Centro de Microscopia da UFMG, Brasil.

3.9 Ensaio de Imunofluorescência

Para análise de imunofluorescência (IF), 3×10^5 células *V. vermiformis* foram adicionadas a lâminas de vidro redondas, e após incubação durante 24 h a 32°C, as células

foram infectadas em um M.O.I. de 5. Após 1, 3, 6, 8, 12 e 24 h.p.i., ascélulas foram fixadas com acetona por 10 min a - 20 °C. Após a fixação, anticorpos policlonais anti-orpheovírus produzidos em camundongos (1: 400 diluídos em PBS) foram adicionados e mantidos em contato com as células por 1 hora a 37 °C, seguidos por três lavagens com PBS. Os anticorpos anti-orpheovírus foram produzidos pelo Dr. Maurício Teixeira Lima e cedidos gentilmente para realização desta etapa do trabalho. As células foram então incubadas com albumina sérica bovina (Sigma) a 3% (BSA -PBS) por 30 minutos, seguidas de três lavagens com PBS. Após 1 hora de incubação com anticorpos secundários anti-mouse (Promega) (1: 400 diluídos em PBS), seguiu-se por três lavagens com PBS.

As células também foram incubadas com DAPI (Sigma, EUA) (1: 1000 diluído em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com rodamina-faloidina (Invitrogen) (1: 1000 diluído em PBS) por 1 h à temperatura ambiente. As células não infectadas (controle) também foram fixadas e preparadas como descrito acima. As células marcadas com fluorescência foram observadas usando microscópio Axio Imager Z2-Apotome 2(Zeiss). O software Zen Lite da microscopia Zeiss foi utilizado para processamento de imagens no Centro de Microscopia da UFMG, Brasil.

Para avaliar o papel das membranas celulares na multiplicação viral, $1,4 \times 10^6$ células de *V. vermiformis* cultivadas em garrafas de 75 cm² (NuncTM Cell Culture Treated Flasks, Thermo Fischer Scientific, USA) foram infectadas com orpheovírus em um M.O.I. de 5. Trinta minutos após a infecção, as amebas foram lavadas com PBS e posteriormente foi adicionado 15 mL de meio PYG e mantidas a 32°C. Após 1 h, Brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich, EUA), um inibidor do tráfego de membranas, foi adicionado na concentração final de 10 µM e 8 horas após a infecção, as amebas foram coletadas para análise através de MET. As amostras foram preparadas para MET como descrito anteriormente e analisadas no Centro de Microscopia da UFMG.

4 RESULTADOS

4.1 Análise aprofundada de etapas do ciclo de multiplicação de Orpheovírus em *V. vermiformis*

4.1.1 A caracterização do efeito citopático do orpheovirus evidencia alterações morfológicas e aumento da motilidade de *V. vermiformis*.

Com objetivo de caracterizar o ECP do orpheovirus, células de *V. vermiformis* foram infectadas no M.O.I. de 10 e observadas por 24 horas pós-infecção (h.p.i.). Através de microscopia óptica, foi observado células esticadas em formato fusiforme 3 h.p.i., tornando-se mais evidente em 9 h.p.i. e 12h.p.i., respectivamente (Fig. 16a). Além disso, 12 h.p.i. algumas células fusiformes ramificadas foram observadas (Fig. 16a). Em 24 h.p.i., a maioria das células observadas estavam arredondadas, porém algumas células fusiformes ainda foram visualizadas. Foi observado também lise celular mais evidente em momentos tardios da infecção (Fig. 16a). Para caracterização dos morfotipos celulares durante a infecção viral, foram realizadas contagens de células normais (morfologia típica das células de controle), fusiformes (ramificadas e não ramificadas) e arredondadas por microscopia óptica. Foi observado uma diminuição das células normais, enquanto a contagem de células fusiformes aumentou 9 h.p.i., compondo aproximadamente 40% do total de células infectadas. 24 h.p.i., a maioria das células se apresentam arredondadas, mas também foram observadas algumas células fusiformes (~ 20%) (Fig. 16b).

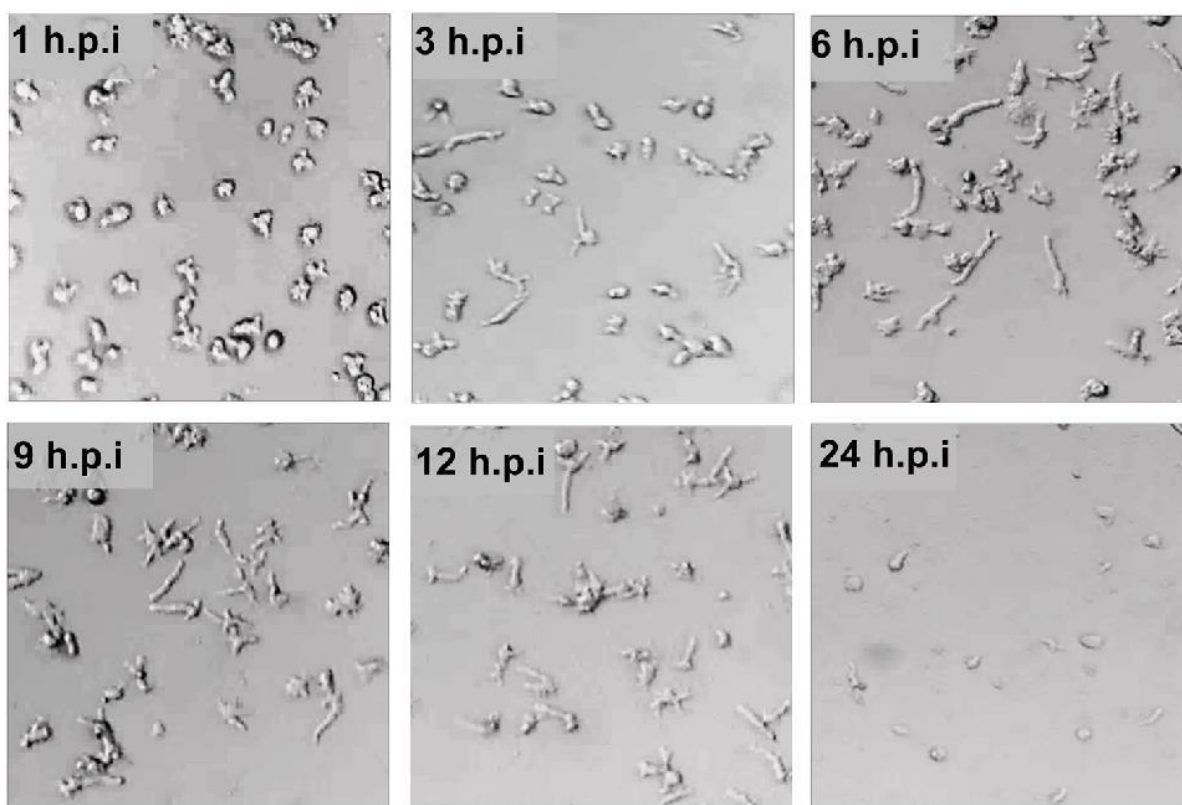
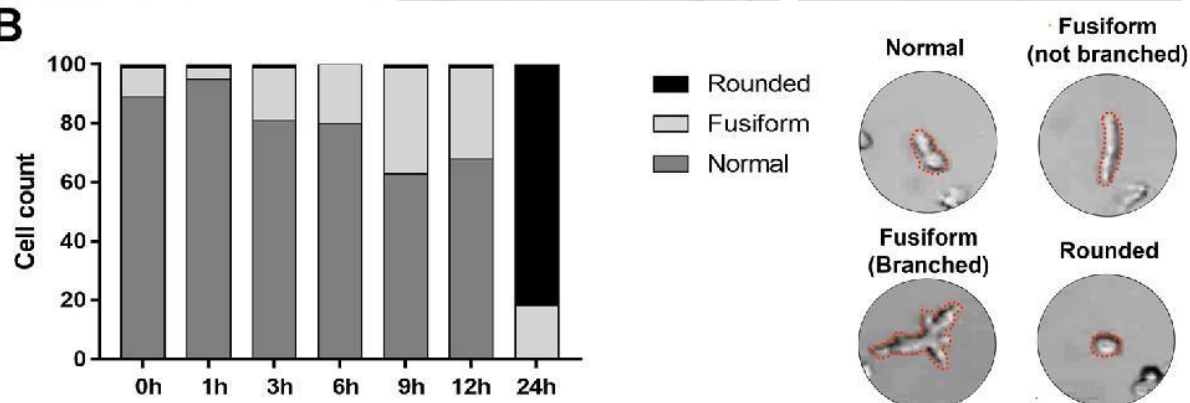
A**B**

Figura 16. (A) Caracterização do efeito citopático desencadeado pela infecção de *V. vermiformis* por orpheovírus ao longo de diferentes tempos de infecção. (B) Contagem de células normais, fusiformes (ramificadas e não-ramificadas) e arredondadas e imagens dos quatro morfotipos celulares visualizados por microscopia óptica.

Diferentes tempos de infecção foram selecionados para o ensaio de IF realizado em M.O.I. de 5. Ensaio de IF utilizando anticorpos primários anti-orpheovírus em 1 h.p.i. revelaram partículas sendo endocitadas por amebas (Fig. 17). Em 3 h.p.i. e 6 h.p.i., respectivamente, foi visualizado um aumento na quantidade de partículas internalizadas pelas células hospedeiras. Foi também observado células fusiformes 12 h.p.i., bem como uma polarização de partículas virais em suas extremidades. Além disso, um número crescente de partículas fora das células pôde ser visualizado (Fig. 17). Em 24 h.p.i., muitas células se

apresentavam arredondadas e a grande maioria das amebas já estava lisadas (Fig. 17). O ECP desencadeado pelo orpheovírus é diferente dos descritos anteriormente para o Faustovírus, que revelou a formação de unidades formadoras de placas, e tupanvirus, caracterizado por agregados de amebas em formato de cachos, bem como arredondamento e lise em *V. vermiformis* (BORGES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019). Além disso, foi observado que a infecção por orpheovírus induz um aumento na motilidade das células de *V. vermiformis*, principalmente aquelas com formato fusiforme. Este efeito inicia 6 h.p.i. e torna-se mais evidente 12 h.p.i.

Como descrito anteriormente, as alterações morfológicas desencadeadas pelo orpheovírus são diferentes das descritas para outros vírus gigantes, apresentando células com formas fusiformes e algumas células ramificadas. Sabe-se que a maioria dos vírus gigantes desencadeia o arredondamento celular, o que impede a formação de pseudópodes e, conseqüentemente, diminui a motilidade das amebas. Curiosamente, além das alterações morfológicas, observamos um aumento na motilidade celular de *V. vermiformis*, nunca descrito anteriormente de acordo com nosso conhecimento. Uma hipótese, é que esse aumento da motilidade seria uma estratégia que facilitaria a infecção de células vizinhas, levando a um aumento da disseminação de partículas virais.

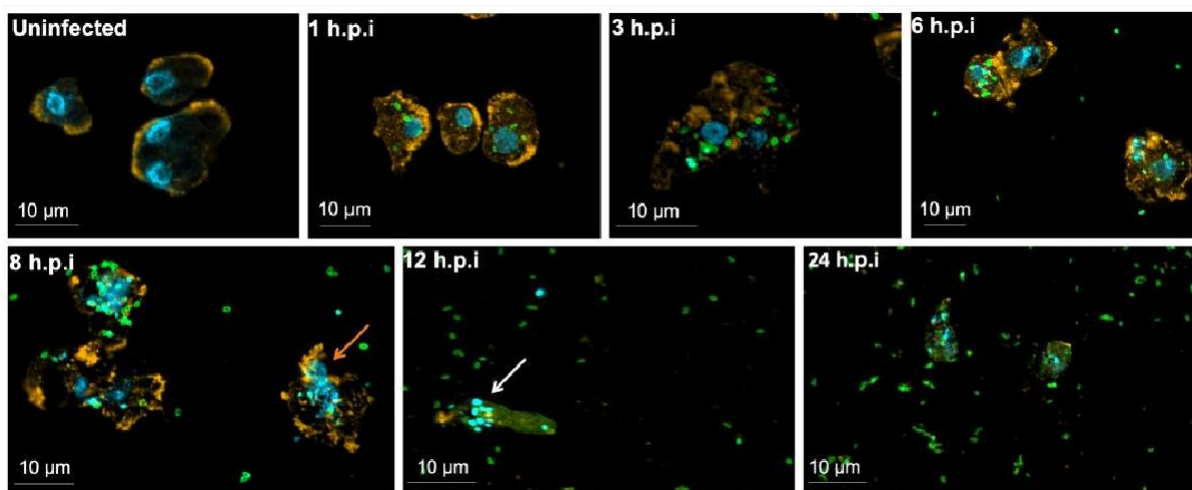


Figura 17. Caracterização do ciclo de orpheovírus em *V. vermiformis* através de ensaio de IF. Células de *V. vermiformis* foram infectadas com M.O.I de 5 e visualizadas por IF.

Em tempos iniciais de infecção partículas de orpheovírus são visualizadas aderidas à superfície das amebas. 3, 6 e 8 h.p.i é observado um aumento de partículas no interior das células hospedeiras (evidenciado com seta laranja). 12 h.p.i é observado uma polarização de partículas em uma extremidade da célula, bem como um aumento de partículas fora das células hospedeiras (evidenciado com seta branca). 24 h.p.i muitas células se encontram arredondadas

e a maioria das amebas lisadas. As partículas virais estão em verde (anticorpo anti-orpheovírus), citoesqueleto de ameba em laranja (corado por rodamina-faloidina) e o núcleo em azul (corado por DAPI). Barra de escala, 10 µm.

4.1.2 Orpheovírus é fagocitado e induz a formação de FV elétron-lucentes e alterações citoplasmáticas envolvendo diferentes organelas.

Devido ao orpheovírus apresentar partículas com grandes dimensões (900-1.100 nm), foi proposto que sua penetração nas células de *V. vermiformis* ocorresse através de fagocitose (ANDREANI et al., 2018). A estratégia de penetração por fagocitose tem sido frequentemente descrita para outros vírus gigantes, sendo demonstrado através de ensaios biológicos com inibidores farmacológicos para pandoravírus, APMV e Cedratvirus getuliensis, impactando consideravelmente os títulos virais (ANDRADE et al. 2019; ANDRADE et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Durante as primeiras etapas do ciclo de multiplicação, foi visualizado através de MEV a formação de pseudópodes em contato com partículas de orpheovírus na superfície celular (Fig. 18a). Desta forma, reforça o fato de que a fagocitose seria a principal estratégia de penetração explorada, como sugerido em estudo anterior (ANDREANI et al., 2018). Porém, outros mecanismos de penetração não devem ser descartados e precisam de novas análises para comprovação. Análises de IF demonstraram que mais de uma partícula é capaz de penetrar na célula hospedeira (Fig. 18b). Após sua internalização, foi observado através de MET, que o conteúdo interno da partícula é liberado no citoplasma celular através de um ostíolo localizado em seu ápice (Fig. 18c). Esse mecanismo também é descrito para outros vírus gigantes que possuem partículas com morfologia semelhante e estão filogeneticamente relacionadas ao orpheovírus, como cedratvírus e pithovírus (SILVA et al., 2018; LEGENDRE et al., 2014).

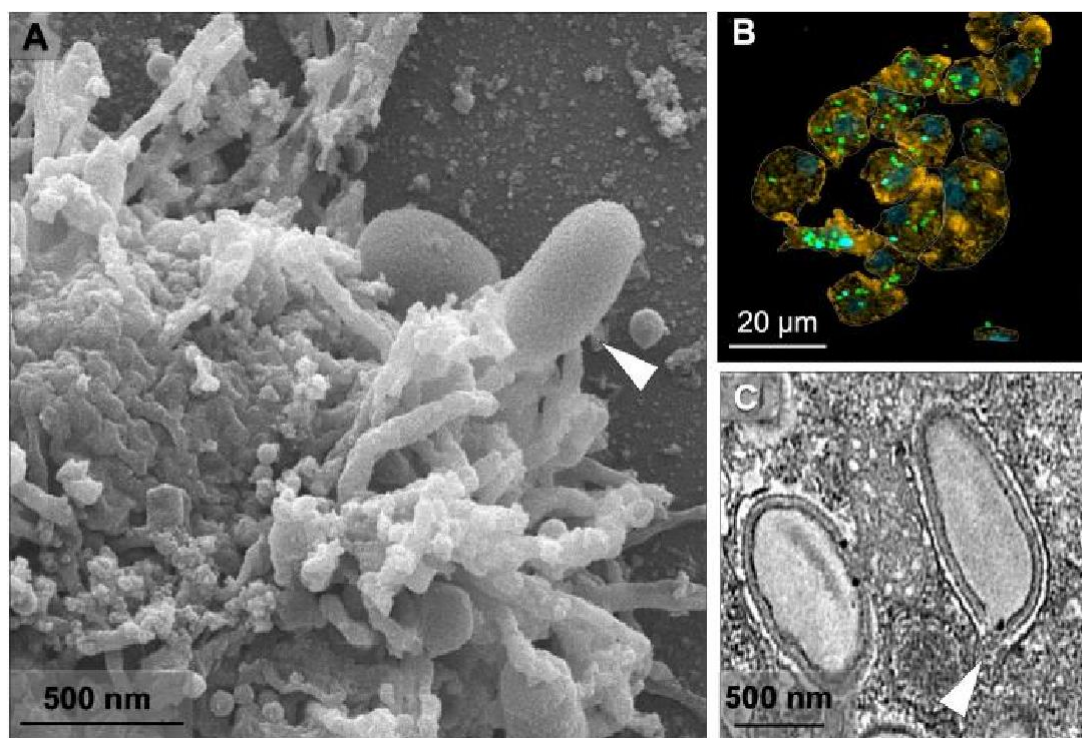


Figura 18. MEV evidenciando partículas de orpheovírus aderidas à superfície de células de *V. vermiformis* (seta branca) (A). Análises de IF 1 h.p.i revelam que mais de uma partícula é capaz de penetrar na célula hospedeira (B). Imagem de MET demonstra que o conteúdo interno da partícula é liberado por um ostíolo localizado em seu ápice (seta branca) (C).

Como descrito anteriormente para outros vírus gigantes, a morfogênese do orpheovírus ocorre em microambientes subcelulares denominados FV, localizados no citoplasma da célula hospedeira. Semelhante às FV descritas para cedratvírus e pandoravírus, as observadas para orpheovírus são grandes áreas elétron-lucentes, que ocupam grande parte da célula hospedeira (Fig. 19a e b). Além disso, não exibem zonas definidas, como observado para mimivírus (ANDRADE et al., 2017). Também foi demonstrado por MET que sua formação é localizada em regiões perinucleares e, diferentemente dos descritos para os pandoravírus, o núcleo da célula hospedeira permanece presente durante a infecção (Fig. 19a — c) (ANDRADE et al., 2019).

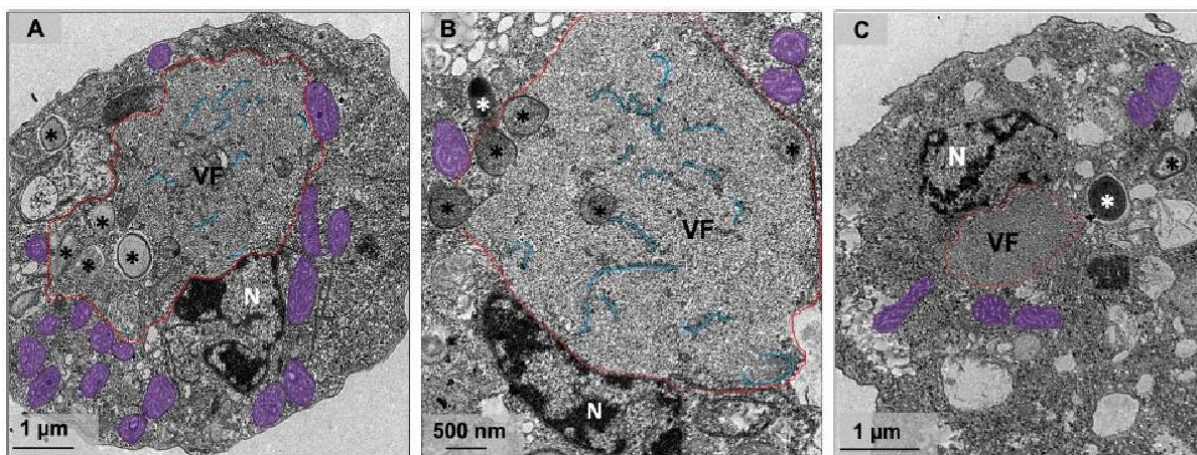


Figura 19. Imagem de MET demonstra que orpheovírus apresenta FV elétron-lucentes (contornadas em vermelho), que ocupam grande parte da célula hospedeira, sendo observadas em regiões perinucleares. Também foi observado o recrutamento de membrana no interior da FV (azul), e que o núcleo celular permanece presente durante a infecção (A-B). O tratamento com BFA afetou tanto a formação de FV quanto a morfogênese de novas partículas (C).

Curiosamente, a formação de FV com a presença de partículas dentro projeções celulares denominadas *blebs*, em etapas avançadas do ciclo de multiplicação viral, foi evidenciada por imagens de MET (Fig. 20a e b). A indução da formação de blebs também foi descrita mediante infecções por Cedratvirus getuliensis em células de *A. castellanii*, porém esse achado requer mais investigações (SILVA et al. 2018).

Além disso, também foi observado um recrutamento de mitocôndrias tanto nas regiões periféricas quanto no interior das FV (Fig. 20c), bem como um recrutamento de membranas (Fig. 19a e b). O tratamento de células infectadas com BFA, um inibidor de tráfico de membranas 8 h.p.i., afetou tanto a formação de FV quanto a morfogênese de novas partículas (Fig. 19c). Assim como observado para orpheovírus, foi demonstrado recentemente que as vesículas do Marseillevírus consistem de membranas oriundas do retículo endoplasmático e, após tratamento com inibidores, foi demonstrado uma diminuição na formação de novas partículas e vesículas (ARANTES et al., 2016). Desta forma, é sugerido que o recrutamento de membranas observado no interior das FV seja importante para as fases de morfogênese e formação de vesículas para posterior exocitose das partículas. No entanto, a origem das membranas precisa ser investigada.

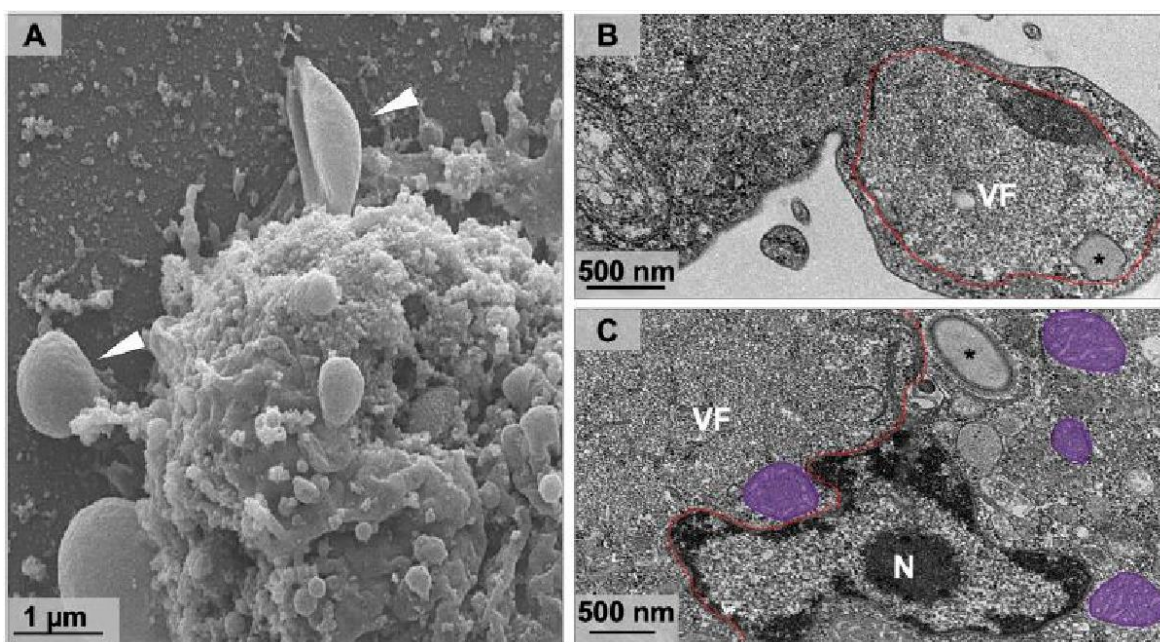


Figura 20. Imagem de MEV demonstrou a formação de *blebs* (seta branca) induzida pela infecção por orpheovírus (A). Imagem de MET revelou a formação de FV com presença de partículas no interior de *blebs* em etapas avançadas do ciclo de multiplicação viral (B). Recrutamento de mitocôndrias (roxo) também foi observado nas regiões periféricas e no interior das FV (C).

4.1.3 Dinâmica de morfogênese de novas partículas de orpheovírus

Com a análise de imagens de MET mediante infecções assíncronas de orpheovírus (M.O.I. de 0,01), foi visualizada a formação de FV que apresentavam partículas em diferentes estágios de maturação (Fig. 21a). Desta forma, foram obtidas mais informações sobre a síntese de novas partículas. A morfogênese tem início com a formação de estruturas semicirculares elétrons-densas denominadas crescentes, assim como observado para outros vírus gigantes, como o Faustovirus e cedratvirus (BORGES et al., 2019, SILVA et al., 2018). Além destes, outros vírus pertencentes ao grupo dos NCLDV como os poxvírus também apresentam a formação de crescentes em etapas iniciais da morfogênese (MARURI-AVIDAL et al., 2011). Posteriormente as crescentes se estendem e vão sendo preenchidas pelo seu conteúdo interno até a formação de partículas maduras (Fig. 21b-f). Também foi observado o recrutamento de estruturas lamelares na periferia das partículas em montagem (Fig. 21e). Essas estruturas podem ser importantes para a formação das partículas, as quais parecem ser compostas por várias camadas de proteínas e membranas. Tanto pelas imagens MET como de MEV, foi evidenciado que as partículas maduras têm um achatamento em uma de suas laterais (Fig. 21g-h).

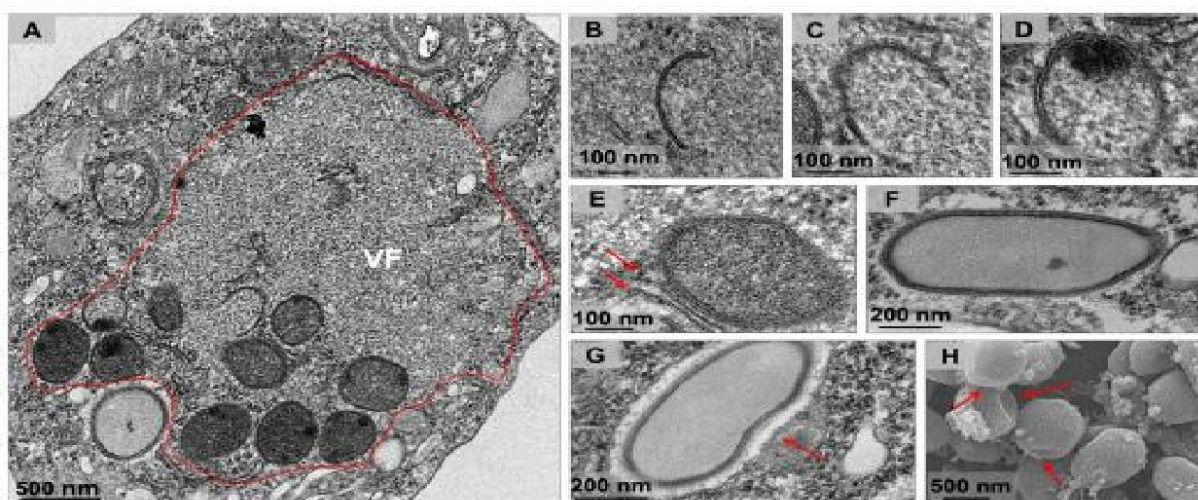


Figura 21. Imagem de MET que evidencia a formação de FV de orpheovírus, as quais apresentam partículas em diferentes estágios de maturação (A). Estrutura em formato de crescente em etapas iniciais da morfogênese (B). Estrutura em formato de crescente se expandindo e sendo preenchida pelo seu conteúdo interno (C-D). Recrutamento de membranas na periferia das partículas durante montagem (seta vermelha) (E). Partícula madura de orpheovírus (F). Imagens de MET e MEV evidenciam achatamento nas laterais das partículas (G-H).

Para analisar cronologicamente a replicação do genoma viral e formação de partículas infecciosas, foram realizados ensaios de curva de ciclo único. Foi observado um aumento na amplificação do genoma 9 h.p.i., e a detecção de partículas infecciosas somente 12 h.p.i. (Fig. 22a-b). Em 48 h.p.i., tanto a formação de novos vírions quanto a replicação do genoma de orpheovírus atingiu um platô (Fig. 22a-b). Os dados corroboram os descritos anteriormente (ANDREANI et al., 2018), os quais sugerem que o ciclo do orpheovírus em *V. vermiformis* é mais lento em comparação com outros vírus gigantes que se multiplicam em *A. castellanii*, tendo duração aproximadamente de 30 h.p.i. Outros vírus gigantes, como tupanvirus, kaumobavirus e Faustovirus, capazes de infectar *V. vermiformis*, também demonstraram ter um ciclo de multiplicação de duração mais longa (SILVA et al., 2019; BJARAI et al., 2016; BORGES et al., 2019). Isso sugere que o perfil de duração do ciclo de multiplicação desses vírus pode estar relacionado ao seu hospedeiro.

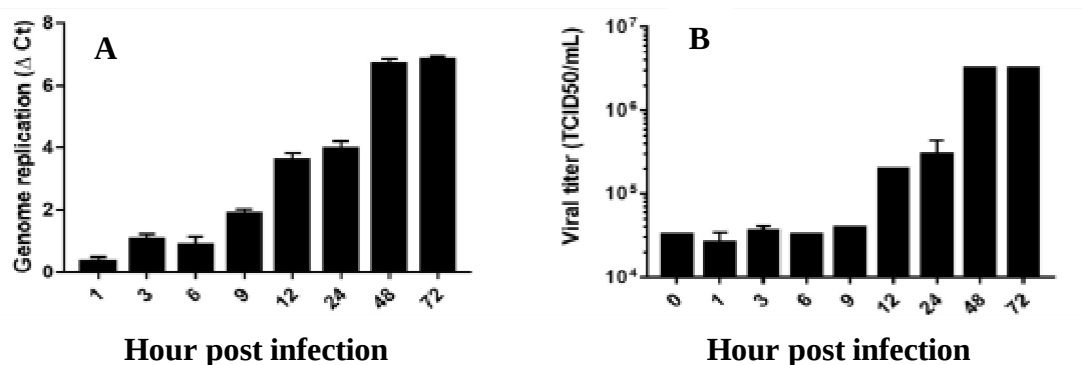


Figura 22. Ensaio de curva de ciclo único de orpheovírus por cópias genômicas em diferentes tempos de infecção (A) e por títulos virais em diferentes tempos de infecção (B).

Além disso, foi observado que as partículas de orpheovírus apresentam uma camada de fibrila menor em comparação às observadas em outros vírus gigantes (Fig. 23a-b). Apesar de haver pouca informação sobre a constituição de suas fibrilas, podem estar relacionadas com adesão na célula hospedeira como demonstrado anteriormente para os mimivírus (RODRIGUES et al., 2015). Embora as partículas de orpheovírus apresentem uma forma ovóide, semelhantes aos pandoravírus, cedratvírus e pithovírus, suas partículas apresentam estrutura distinta. Análises revelaram que as partículas são constituídas de uma camada externa, uma camada do capsídeo e uma membrana interna que envolve o cerne da partícula (Fig. 23a-b). Vale ressaltar que mesmo em infecções com baixa M.O.I., a presença de partículas defectivas em diferentes formatos foram observadas (Fig. 24a-c). Essa descoberta sugere que partículas malformadas ocorrem naturalmente, o que é semelhante ao descrito para outros vírus gigantes (ANDREANI et al., 2018; ANDRADE et al., 2017; SILVA et al., 2018).

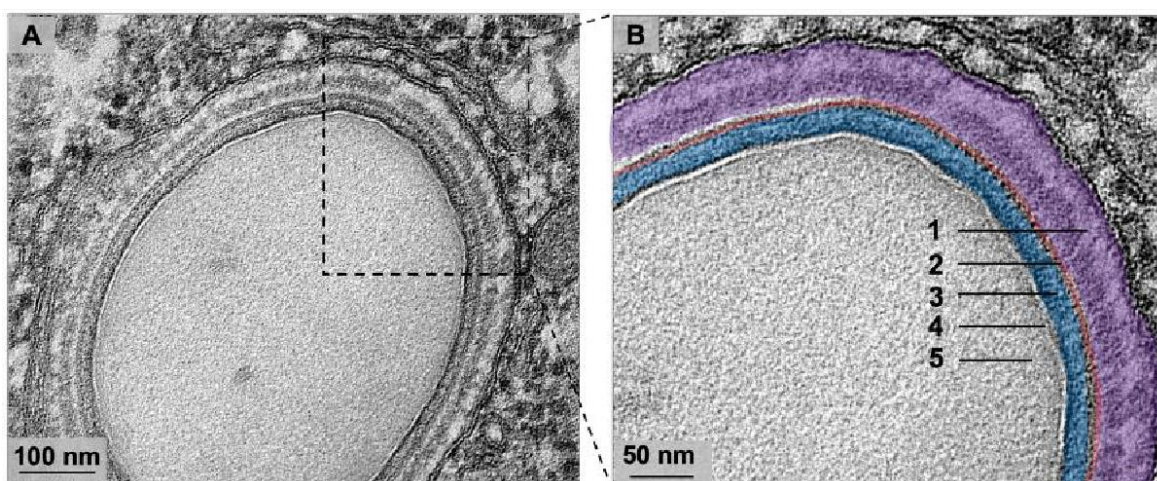


Figura 23. Análises de MET revelaram que as partículas maduras apresentam uma pequena camada de fibrila (1, roxa), uma camada externa (2, vermelha), a camada do capsídio (3, azul) e uma membrana interna (4, branca) que envolve o núcleo da partícula (5, cinza).

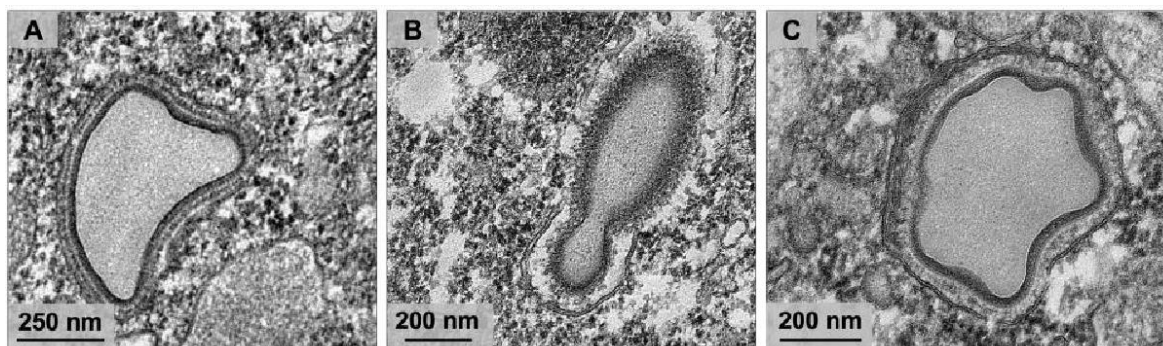


Figura 24. Imagens de MET evidenciam a presença de partículas defectivas em diferentes formatos, mesmo em infecções com M.O.I. de 0,01 (A-C).

4.1.4 Liberação de partículas de orpheovírus por lise ou exocitose

Após a formação das FV, expansão das crescentes e maturação completa, novas partículas foram visualizadas em regiões periféricas no citoplasma da célula hospedeira (Fig. 25a). Algumas são observadas envolvidas por membranas. Além disso, foi observada a presença de uma ou mais partículas no interior do mesmo vacúolo, o qual pode apresentar uma ou mais membranas (Fig. 25b-d).

A presença de partículas virais em vacúolos também foi relatada para outros vírus gigantes, como os pithovírus e pandoravírus, o que sugere que as partículas são liberadas da célula hospedeira por exocitose (ANDRADE et al., 2019; LEGENDRE et al., 2014; LEGENDRE et al., 2018). Para confirmação, ensaios biológicos incluindo a contagem de células e partículas no sobrenadante foram realizados ao longo do ciclo de replicação em M.O.I. = 5.

As análises revelaram que as partículas de orpheovírus podem ser detectadas no sobrenadante das células infectadas, mesmo nos momentos em que não é observada lise celular (Fig. 25e-f). Um aumento no número de partículas foi observado no sobrenadante em 12 h.p.i. Além disso, ensaios de IF realizados em diferentes momentos ao longo do ciclo também demonstraram um aumento no número de partículas fora das células 12 h.p.i. e 24 h.p.i., respectivamente (Fig. 25e e Fig. 17). Sendo assim, estes dados reforçam a hipótese de exocitose como uma estratégia alternativa para a liberação de partículas da célula hospedeira (Fig. 26a), embora a lise celular também tenha sido demonstrada por imagens MEV (Fig. 26b).

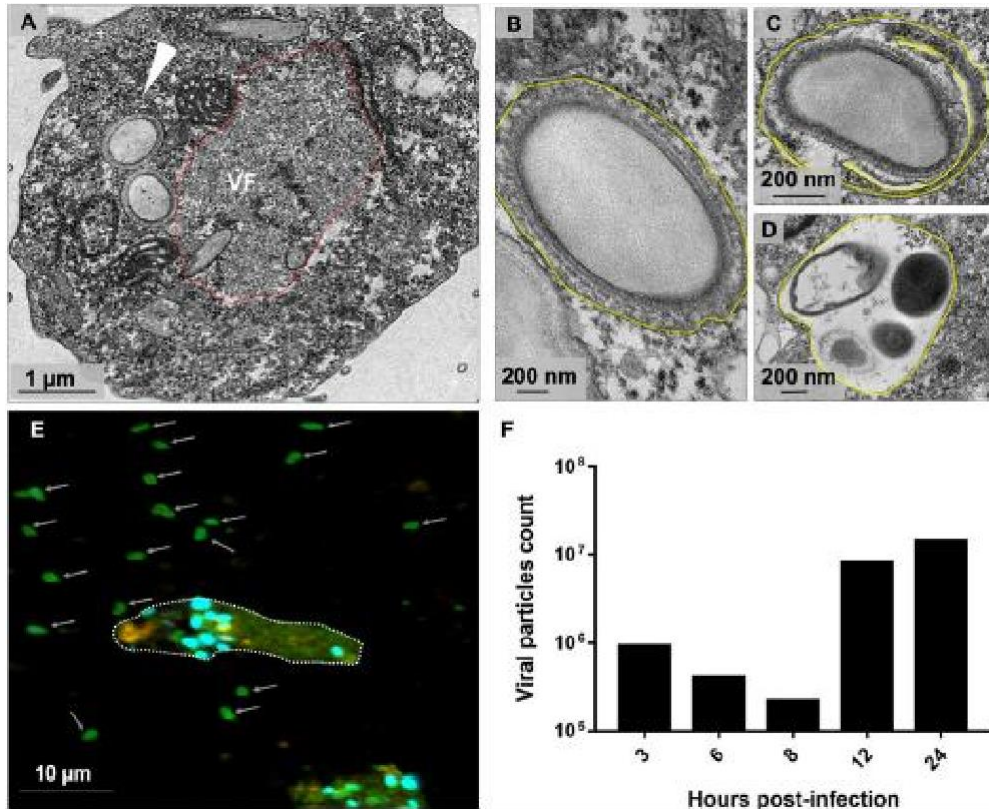


Figura 25. Imagem de MET evidenciando novas partículas em regiões periféricas no citoplasma da célula hospedeira (seta branca) (A). Algumas partículas foram observadas envolvidas por uma ou mais membranas (destacadas em amarelo) (B-C). Mais de uma partícula no mesmo vacúolo foram observadas (D). Ensaios IF 12 h.p.i demonstram células em formato fusiformes e um aumento de partículas fora das células hospedeiras liberadas por exocitose (setas brancas) (E). Contagem de partículas no sobrenadante ao longo do ciclo de replicação (M.O.I. = 5) (F).

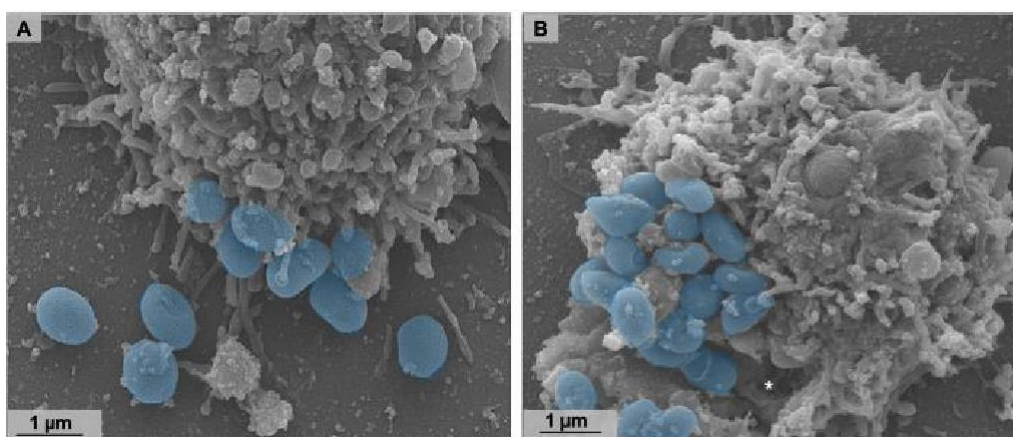


Figura 26. Imagens de MEV evidenciando partículas de orpheovírus sendo liberadas da célula hospedeira por exocitose (A) e lise celular (B). As partículas virais foram coloridas digitalmente em azul.

CAPÍTULO II
ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA DE *Nucleocytoviricota*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Expressão gênica temporal em NCLDV

A maioria dos vírus de RNA utilizam enzimas específicas codificadas para síntese de seu mRNA. Assim como estes, alguns vírus de DNA que possuem genomas de tamanho pequeno ou intermediário como parvovírus, papillomavírus e adenovírus dependem de enzimas da célula hospedeira para transcrição de seu genoma, incluindo a RNA polimerase. No entanto, vírus que apresentam genomas maiores como a maioria dos que pertencem ao grupo dos NCLDV, codificam seu próprio aparato transcricional. Devido a isso, estes apresentam uma relativa independência da maquinaria de transcrição de seus hospedeiros (ABERGEL *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A transcrição do genoma dos vírus pertencentes a este grupo ocorre de forma temporal no citoplasma da célula hospedeira. No início da infecção, um conjunto de proteínas codificadas imediatamente precoces são necessárias para replicação do DNA e manipulação da célula hospedeira. Além disso, mRNA precoces também codificam enzimas e fatores necessários para transcrição de genes intermediários. Concomitantemente com a expressão de genes intermediários, a expressão de genes precoces é reprimida. Ao final, genes tardios são transcritos, direcionando a síntese de proteínas estruturais, proteínas não estruturais e enzimas presentes em partículas maduras (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os produtos codificados por genes tardios incluem fatores de transcrição precoces, os quais são empacotados juntamente com a RNA polimerase e outras enzimas no interior da progênie viral. A transcrição temporal é possibilitada devido à presença de sequências promotoras que direcionam onde, quando e em que nível as classes de genes iniciais, intermediários e tardios são transcritos. Estas sequências são diferentes entre as três classes de genes, porém são conservadas entre o mesmo grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2017; LEGENDRE *et al.*, 2017).

Como descrito anteriormente a regulação da expressão gênica ocorre de forma temporal, sendo os genes transcritos classificados em precoces, intermediários e tardios, de acordo com o estágio de infecção em que são expressos. Um estudo anterior dividiu os genes de NCLDV em clusters de grupos

ortólogos (NCVOGs), muitos dos quais poderiam ser atribuídos a classes funcionais (YUTIN et al., 2009).

A expressão de cada classe de gene ocorre em cascata. Isso se deve ao fato de que os fatores de transcrição necessários para a expressão de cada classe de genes são produtos dos genes previamente expressos (BROYLES et al., 2010). Dessa forma, os produtos de alguns genes expressos precocemente durante o ciclo de replicação do vírus serão necessários como fatores de transcrição para induzir a expressão de outros genes que serão expressos durante o curso intermediário e posterior da infecção. Apesar de ter um perfil de regulação transcricional semelhante, a expressão dos genes de cada classe temporal ocorre em tempos diferentes entre os NCLDV, devido ao fato de seus ciclos de replicação durarem em tempos diferentes. No entanto, a expressão de genes de diferentes classes de tempo ocorre em momentos semelhantes ao longo do ciclo de multiplicação de NCLDV, ou seja, precoce, intermediário e tardio durante o curso da infecção (OLIVEIRA et al., 2017; BROYLES et al., 2010).

Tal classificação temporal tem sido possível devido ao desenvolvimento de novas técnicas para quantificar os níveis de expressão de um grande número de genes (KOGENARU et al., 2012). Nos estudos selecionados para análise comparativa dos genes expressos de NCLDV realizada no presente trabalho foram utilizadas técnicas como microarranjos de DNA, os quais foram uma das primeiras ferramentas a permitir o estudo em larga escala do transcriptoma. A técnica é baseada na hibridação de fitas alvo na 9^a fita da sonda complementar, permitindo a identificação de genes que são expressos em diferentes momentos durante a infecção viral. Uma das principais limitações dessa técnica é avaliar genes com baixa expressão. No entanto, o avanço das ferramentas de sequenciamento em larga escala permitiu uma avaliação mais robusta do transcriptoma dos vírus. Outra técnica utilizada foi o sequenciamento de RNA (RNA-seq), o qual tem sido amplamente descrita para estudar o perfil de expressão gênica de organismos e vírus, permitindo uma compreensão mais aprofundada de seu padrão de transcrição. Essa técnica fornece o sequenciamento completo de todos os genes expressos durante o ciclo de replicação de um vírus, mesmo que os genes tenham um baixo nível de expressão (dependendo da cobertura do sequenciamento), permitindo uma melhor caracterização do transcriptoma do vírus. Embora essas ferramentas sejam baseadas em tecnologias distintas, as duas técnicas permitem quantificar os níveis de expressão gênica e tiveram abrangência semelhante em estudos que compararam as duas técnicas. Portanto, podem ser usados de forma comparativa ou complementar em estudos envolvendo expressão gênica (KOGENARU et al., 2012). Essas técnicas têm sido utilizadas para estudar o perfil de

expressão de diferentes vírus grandes e gigantes, como ficará evidente nas seções subsequentes, fornecendo informações importantes sobre a biologia desses vírus.

A habilidade de regular temporalmente a transcrição de genes é caracterizada como uma vantagem evolutiva. Sendo assim, alguns vírus pertencentes ao grupo dos NCLDV têm sido estudados no campo da biotecnologia como vetores de expressão para síntese de proteínas e como candidatos a produção de vacinas (BROYLES et al., 2010). Desta forma, o estudo e o entendimento da regulação e expressão gênica deste grupo de vírus podem contribuir para o campo da biotecnologia, bem como podem fornecer informações importantes para a compreensão da biologia e interação com seus hospedeiros.

1.2 Expressão gênica temporal em *Poxviridae*

Entre as famílias virais que compõem o NCLDV, *Poxviridae* é de longe o grupo mais estudado. A complexidade do genoma do poxvírus instigou a especulação de que esses vírus sintetizam seu genoma independentemente do núcleo do hospedeiro. A transcrição de genes de poxvírus segue um perfil temporal e é regulada por regiões promotoras e fatores de transcrição. Assim, os genes são classificados em precoces, intermediários e tardios, e são ativados em uma sequência em cascata (OLIVEIRA et al., 2017; BROYLES et al., 2010).

Os primeiros genes transcritos codificam proteínas necessárias para a replicação do DNA, transcrição de genes intermediários e evasão das defesas do hospedeiro, enquanto os genes intermediários e tardios codificam proteínas estruturais que participam da morfogênese da progênie viral (BROYLES et al., 2010). Além disso, os genes transcritos posteriormente codificam componentes do aparelho transcricional inicial, presente na partícula madura. Após a entrada e liberação do conteúdo genético no citoplasma da célula hospedeira, os fatores de transcrição iniciais ligam-se às sequências promotoras nas regiões a montante e a jusante do local de início da transcrição, deixando a sequência do gene intermediário disponível para a RNA polimerase viral (BROYLES et al., 2010; CASSETTI et al., 2010). Posteriormente, a RNA polimerase é recrutada, formando um complexo com fatores de transcrição precoces, fatores de terminação e poli (A) polimerases, que se ligam à RNA polimerase através do domínio RAP94 (MOHAMED et al., 2001). A transcrição de genes intermediários e tardios ocorre imediatamente após o início da síntese de DNA. Algumas proteínas como VITF-1, uma subunidade da RNA polimerase, bem como uma enzima de capping viral e um heterodímero de VITF-3, foram identificadas como necessárias para a transcrição de genes intermediários (BROYLES et al., HARRIS et al., 1993; SANZ et al., 1999). No entanto, para a transcrição tardia do gene, as proteínas A1L, A2L, G8R, H5R e VTF-X foram identificadas como

essenciais. Essas proteínas foram descritas como apresentando atividade como fatores de transcrição tardia (WRIGHT et al., 2001). Análises realizadas com células infectadas com vírus da varíola bovina (CPXV), vírus da varíola dos macacos (MPXV), vírus da vacina (VACV) demonstraram que aproximadamente 96% dos transcritos celulares não alteraram o perfil de expressão. Dos genes celulares que alteraram o perfil de expressão, 64,3%, 68,2% e 70% tiveram aumento no perfil de expressão modulado pela infecção por CPXV, MPXV e VACV, respectivamente. Além disso, foi identificado um padrão típico de modulação transcricional entre os três vírus. Sendo assim, dos 321 transcritos de células hospedeiras modulados pela infecção pelo MPXV, 241 (75,1%) também são modulados pelo CPXV e 148 (46,1%) pelo VACV (BOURQUAIN et al., 2013). Este perfil temporal de transcrição parece ser uma característica comum não apenas entre membros da família Poxviridae, mas também de outros vírus relacionados filogeneticamente aos poxvírus, como os asfarvírus que infectam mamíferos.

1.3 Expressão gênica temporal em *Iridoviridae*

Como outros membros do filo *Nucleocyotviricota*, sua replicação ocorre parcialmente no citoplasma da célula hospedeira. Mesmo com subunidades homólogas de RNA polimerase no genoma do iridovírus, a RNA polimerase da célula hospedeira é necessária para sintetizar os primeiros transcritos de genes de vírus pertencentes aos gêneros *Ranavirus* e *Iridovirus* (OLIVEIRA et al., 2017; GOORHA et al., 1981). Assim, 217 mRNAs iniciais são sintetizados no núcleo usando a RNA polimerase II da célula hospedeira nos estágios iniciais. No entanto, acredita-se que os transcritos tardios são sintetizados no citoplasma da célula hospedeira pela RNA polimerase codificada pelo vírus (MAJJI et al., 2009). Sua expressão gênica é regulada temporalmente e resulta na expressão de três classes de genes: 221 imediato precoce, precoce e tardio (MAJJI et al., 2009).

As análises realizadas com membros do gênero *Iridovirus*, como o iridovírus da dourada (RSIV), identificaram nove genes precoces imediatos, 40 genes precoces e 38 genes tardios (LUA et al., 2005). O mesmo perfil temporal de regulação da expressão gênica foi descrito para outros membros da família *Iridoviridae* e do gênero *Ranavirus*, incluindo o vírus da rã 3 (FV-3). Este gene tem 33 genes precoces imediatos, 22 genes precoces e 36 genes tardios (MAJJI et al., 2009). Embora o número de genes pertencentes às diferentes classes de tempo não seja o mesmo, o perfil temporal da regulação da expressão gênica é semelhante entre os membros da

família Iridoviridae. Genes iniciais imediatos são expressos logo após a infecção da célula hospedeira e podem produzir transcritos mesmo na presença de inibidores da síntese de proteínas. Entre os produtos de seus transcritos, alguns fatores irão ativar a transcrição de genes precoces. Os genes iniciais codificam proteínas associadas à replicação do DNA, enquanto os genes tardios são expressos após o início da replicação do DNA viral e codificam a partícula viral (LUA et al., 2005; D’COSTA et al., 2001).

1.4 Expressão gênica temporal em *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*

Assim como outros NCLDV, os mimivírus também têm um perfil de transcrição temporal no qual os genes transcritos são classificados como precoces, intermediários e tardios (LEGENDRE et al., 2010). Os genes classificados como precoces são expressos de 0 a 3 horas após o início da infecção. Essa classe de genes é funcionalmente diversa, mas a maioria deles é composta de genes com funções ainda não definidas. Três aminoacil-tRNA sintetases - TyrRS (L124), MetRS(R639) e ArgRS 326 (R663) - pertencem a esta classe temporal e os pesquisadores sugerem que elas estão envolvidas na tradução de proteínas virais desde o início do ciclo de multiplicação. Além disso, as enzimas envolvidas no reparo do DNA também são expressas durante os estágios iniciais do ciclo de multiplicação (LEGENDRE et al., 2010; LEGENDRE et al., 2011), enquanto os genes classificados como intermediários são expressos entre 3 e 6 horas após o início da infecção; a maioria desses genes codifica proteínas envolvidas no estágio de replicação do DNA, como a DNA polimerase e fatores de transcrição gênica tardia.

Por fim, os genes classificados como tardios são expressos 6 horas após o início da infecção. Esses genes codificam os elementos estruturais, como a principal proteína do capsídeo e enzimas presentes nas partículas que são necessárias no início da infecção. Algumas topoisomerases, importantes na replicação e encapsidação do DNA, também fazem parte da classe de genes tardios. Produtos relacionados à expressão de genes tardios foram detectados por meio de análises proteômicas em proporções mais significativas do que as de outras classes temporais (RAOULT et al., 2004; LEGENDRE et al., 2010).

Devido ao interesse da comunidade científica por esse grupo de vírus, muitos outros vírus gigantes foram isolados ao longo dos anos, identificando grande parte dos patógenos de amebas que nunca haviam sido investigados. Por exemplo, em 2009, os pesquisadores isolaram um novo vírus gigante em uma cultura de *A. polyphaga* chamado *Marseillevirus marseillevirus* (MsV) de amostras de água coletadas em torres de resfriamento em Paris, França. Como os

mimivírus, os Marseillevírus também têm um perfil de transcrição temporal. As análises demonstraram que dos 457 genes identificados a partir de Marseillevírus, 83 (18%) são classificados como precoces (0-1 hpi), 218 (48%) como intermediários (1–2 hpi) e 156 (36%) como tardios (4 hpi). De todos os genes analisados, 316 não têm função conhecida, 36 estão relacionados à replicação e reparo do DNA e 25 estão relacionados à regulação da transdução de sinal. Além disso, genes relacionados ao metabolismo de nucleotídeos (8 genes), transcrição (13 genes), tradução (4 genes) e estrutura viral e morfogênese (10 genes) foram identificados (RODRIGUES et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente o perfil de expressão gênica de diferentes membros do filo *Nucleocyotoviricota*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão em relação aos momentos de expressão de genes de mimivírus, Marseillevírus, poxvírus e iridovírus;
- Analisar funcionalmente genes precoces, intermediários e tardios de mimivírus, Marseillevírus, poxvírus e iridovírus.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise funcional de genes expressos em momentos precoces, intermediários e tardios de infecção de NCLDV

Conforme descrito no tópico 1.1 deste capítulo, os vírus gigantes apresentam a expressão gênica regulada temporalmente. Já existem dados na literatura sobre o transcriptoma completo de alguns destes vírus, como mimivírus, Marseillevírus, vaccinia vírus e frog vírus 3 (MAJJI *et al.*, 2009; LEGENDRE *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2020). Outros vírus pertencentes ao grupo dos NCLDV possuem dados de expressão gênica, porém apenas para determinados conjuntos de genes como para os ascovírus (ZANGHLOUL *et al.*, 2017), ou para determinada classe temporal como realizado para os chlorovírus (BLANC *et al.*, 2014).

Diante dos dados isolados disponíveis na literatura, algumas questões foram levantadas e investigadas nesta tese: As funções observadas em genes expressos em diferentes classes temporais são semelhantes entre diferentes NCLDVs? Quais funções são compartilhadas e predominantes em diferentes classes temporais de genes? Para responder a essas perguntas e obter uma imagem geral deste cenário, realizamos uma análise do perfil de transcrição e realizamos uma análise funcional comparativa de genes expressos de diferentes NCLDVs. Incluímos apenas vírus cujos dados de transcriptoma relacionados à extensão completa do ciclo de replicação estavam disponíveis para permitir uma comparação adequada dos dados: Marseillevirus isolado T19 (número de acesso do GenBank NC_013756.1), APMV (número

de acesso do GenBank NC_014649.1), VACV (Número de acesso do GenBank AY243312.1) e frog vírus 3 (número de acesso do GenBank AY548484.1).

Em um primeiro momento realizamos a categorização dos genes de acordo com o momento em que são expressos. Como mencionado anteriormente, diferentes NCLDV selecionados para o estudo apresentarem duração dos ciclos de multiplicação diferentes, e consequentemente diferentes tempos de expressão se tratando de uma mesma classe temporal de genes. Desta forma, decidimos realizara categorização em classes de genes precoces, intermediários e tardios de acordo com o momento em que são expressos durante o ciclo de multiplicação.

Após reclassificação de acordo com o momento de expressão, foi realizada a reanotação dos genes de cada um dos quatro vírus incluídos neste estudo utilizando a ferramenta BLASTp, considerando E-value $< 10^{-5}$, comparando cada gene contra o banco de dados de proteínas não redundantes (nr) do GenBank. Em paralelo, realizamos a busca de domínios conservados utilizando a ferramenta Interproscan com parâmetros padrão para anotação final. Os genes reanotados foram então classificados em grupos funcionais de acordo com as categorias NCVOGs (YUTIN *et al.*, 2009).

4 RESULTADOS

Como descrito anteriormente, os vírus pertencentes ao filo *Nucleocytoviricota* apresentam transcrição de seus genes de forma temporal, os quais são classificados em precoces, intermediários e tardios. Sendo assim, é descrito que diferentes membros deste grupo apresentam um padrão semelhante de expressão gênica. De acordo com estabelecido por estudos anteriores, os genes pertencentes a este grupo de vírus são divididos em diferentes grupos funcionais, denominados grupos ortólogos de vírus núcleo citoplasmáticos (NCVOGs) (YUTIN *et al.*, 2009).

Para obter uma avaliação clara e permitir uma comparação adequada entre os vírus, os genes foram classificados entre as seguintes classes temporais: precoce, intermediário e tardio, com base nas classificações anteriores (RODRIGUES *et al.*, 2020; LEGENDRE *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011; LUA *et al.*, 2005). É importante observar que o ciclo de replicação de cada vírus tem um intervalo de tempo diferente. Considerando este ponto particular, classificamos os genes em três classes temporais distintas, denominadas precoce, intermediário e tardio, com base no momento em que são expressos de acordo com os dados do transcriptoma, em vez do tempo exato (horas) de expressão para evitar interpretações errôneas dos dados.

4.1 Avaliação do transcriptoma do *Marseillevirus* (*Marseilleviridae*)

O *Marseillevirus* T19 possui 83 genes classificados como precoces (18%), 228 (48%) como intermediários e 156 (34%) como genes de expressão tardia (Figura 27A). As principais funções observadas para genes precoces de *Marseillevirus* estão relacionadas à replicação e recombinação do DNA, transcrição e transdução de sinal e algumas funções metabólicas. Dos 83 genes classificados como precoces, 3 (3,6%) estão relacionados à replicação e recombinação do DNA. A maioria dos genes relacionados à replicação do DNA são expressos em tempos intermediários ou tardios durante a infecção; no entanto, alguns podem ser expressos assim que a partícula é internalizada pela célula hospedeira. Além disso, 7 (8,4%) genes estão relacionados ao processo de transcrição, como os que codificam as subunidades de helicase e RNA polimerase, 13 (15,6%) com regulação e transdução de sinal como algumas quinases, e apenas 1 (1%) relacionado ao metabolismo do nucleotídeo (Figura 27B). A transcrição de genes precoces relacionados à regulação e transdução de sinais, que codificam serina / treonina quinase, sugere que o vírus tem potencial para manipular a resposta

do hospedeiro, facilitando o estabelecimento de infecções produtivas. Em relação aos genes classificados como intermediários, as principais funções observadas também foram relacionadas à replicação e recombinação do DNA (25/218, 11,5%), seguida da regulação da transdução do sinal (8/218, 3,7%).

Curiosamente, muitos genes envolvidos no metabolismo do DNA também são expressos nos estágios finais do ciclo de replicação, sugerindo um processo contínuo de manipulação do DNA durante o ciclo de vida do vírus. A maioria dos genes relacionados à estrutura e morfogênese do vírion são expressos tardiamente (9/53, 16,9%), uma característica esperada considerando que esses genes estão envolvidos na formação de novas partículas virais (Figura 28).

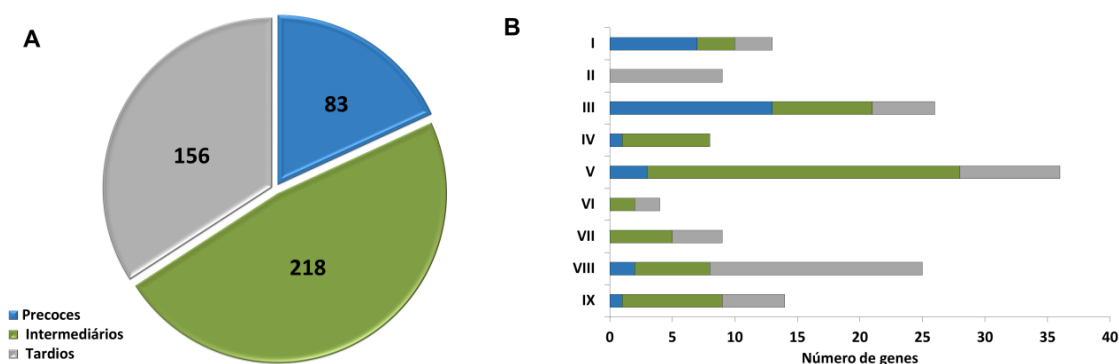


Figura 27. Análise de categorias funcionais e correlação com o perfil de expressão temporal de genes virais. A) Gráfico representando o número de genes de Marseillevirus distribuídos em diferentes classes temporais (precoce, intermediário e tardio). B) Distribuição de genes de diferentes categorias funcionais em classes temporais de expressão gênica. Apenas genes com funções conhecidas são incluídos no gráfico. I, transcrição e processamento de RNA; II, estrutura e morfogênese do vírion; III, transdução de sinal; IV, metabolismo de nucleotídeos; V, replicação, recombinação e reparo de DNA; VI, tradução; VII, interação hospedeiro-vírus; VIII, outras funções metabólicas; IX, diversos.

4.2 Avaliação do transcriptoma do *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (*Mimiviridae*)

APMV tem um total de 979 genes, entretanto para esta análise incluímos apenas genes que tinham dados de transcriptoma disponíveis, sendo um total de 829 genes (LEGENDRE et al., 2010). Os 150 genes restantes ainda precisam ser classificados assim que novos dados forem obtidos. Quase um terço dos genes APMV são expressos precocemente (292, 35,2%), 210 (25,3%) são intermediários e 327 (39,5%) são expressos nos momentos finais do ciclo de multiplicação do vírus (Figura 28A). A maioria dos genes relacionados à replicação, recombinação e reparo do DNA são classificados como genes intermediários, mas existem outros expressos em outros momentos do ciclo de replicação, incluindo DNA primase e algumas helicases (Figura 28B). Os genes envolvidos na transcrição e no processamento do RNA, incluindo fatores de transcrição, são expressos precocemente, enquanto as subunidades da RNA polimerase são expressas principalmente em momentos intermediários, possivelmente sendo importantes para a posterior síntese de transcritos virais. O APMV codifica pelo menos 31 genes envolvidos na regulação da transdução de sinal, incluindo proteínas contendo o domínio F-box e serina / treonina quinases, que são expressos principalmente nos estágios iniciais e intermediários, respectivamente.

Uma característica distinta entre os vírus que o genoma APMV revelou foi a presença de genes relacionados à tradução, incluindo aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) (RAOULT et al., 2004). Um total de oito genes são relacionados ao aparato traducional do APMV, com 4 sendo expressos precocemente, incluindo três aaRS, 3 intermediários (o restante aaRS cai nesta categoria, ou seja, cisteinil-tRNA sintetase) e apenas 1 genes tardios (Figura 28B). Igualmente ao MRSV, a maioria dos genes envolvidos na estrutura dos mimivirus são classificados como genes tardios (14/18, 77,7) (Figura 28B). É interessante notar que a maioria desses genes são genes putativos de membrana, possivelmente envolvidos na formação da fábrica de vírus e no estabelecimento das etapas iniciais da morfogênese dos vírions. O gene que codifica a proteína principal do capsídeo (L425) é classificado como um gene tardio.

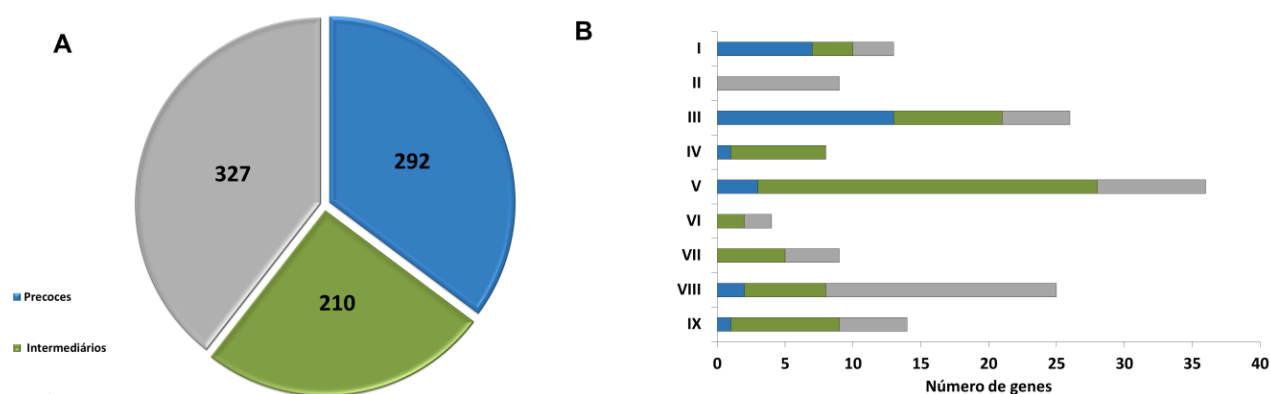


Fig 28. Análise de categorias funcionais e correlação com o perfil de expressão temporal de genes virais. A) Gráfico representando o número de genes mimivírus distribuídos em diferentes classes temporais (precoce, intermediário e tardio). B) Distribuição de genes de diferentes categorias funcionais em classes temporais de expressão gênica. Apenas genes com funções conhecidas são incluídos no gráfico. I, transcrição e processamento de RNA; II, estrutura e morfogênese do vírion; III, transdução de sinal; IV, metabolismo de nucleotídeos; V, replicação, recombinação e reparo de DNA; VI, tradução; VII, interação hospedeiro-vírus; VIII, outras funções metabólicas; IX, diversos.

4.3 Avaliação do transcriptoma do vaccinia virus (*Poxviridae*)

Diferente do MRSV e do APMV, o VACV é um vírus que infecta mamíferos e é um dos vírus mais estudados ao longo da história. Entre os 218 genes, 118 (54,1%) são expressos em momentos iniciais do ciclo de multiplicação, enquanto 51 (23,4%) e 38 (17,4%) são genes intermediários e tardios, respectivamente (Figura 29A). É interessante notar que o VACV tem muitos genes conhecidos relacionados à interação hospedeiro-vírus, a maioria deles (16/19, 84,2%) expressa em momentos iniciais do ciclo de vida do vírus (Figura 29B e 31). Entre esses genes estão incluídos aqueles relacionados à interação da resposta imune do hospedeiro, como o receptor de interferon alfa / beta solúvel e proteínas de ligação a quimiocinas. A maioria dos genes envolvidos na transcrição e no processamento do RNA do VACV são expressos precocemente (18/24, 75%), enquanto somente 4 genes são expressos em tempos intermediários (Figura 29B).

Os genes envolvidos na replicação, recombinação e reparo do DNA são expressos principalmente em momentos precoces (6/10 = 60%), e todos os genes

relacionados à morfogênese do vírion são classificados como genes tardios (Figura 29B). Embora muitos genes do VACV tenham suas funções previstas, quase 40% do genoma do vírus não está caracterizado, e muitos genes ainda precisam ser avaliados funcionalmente, incluindo vários genes anotados e proteína contendo domínio de repetição de anquirina, semelhante a outros NCLDV.

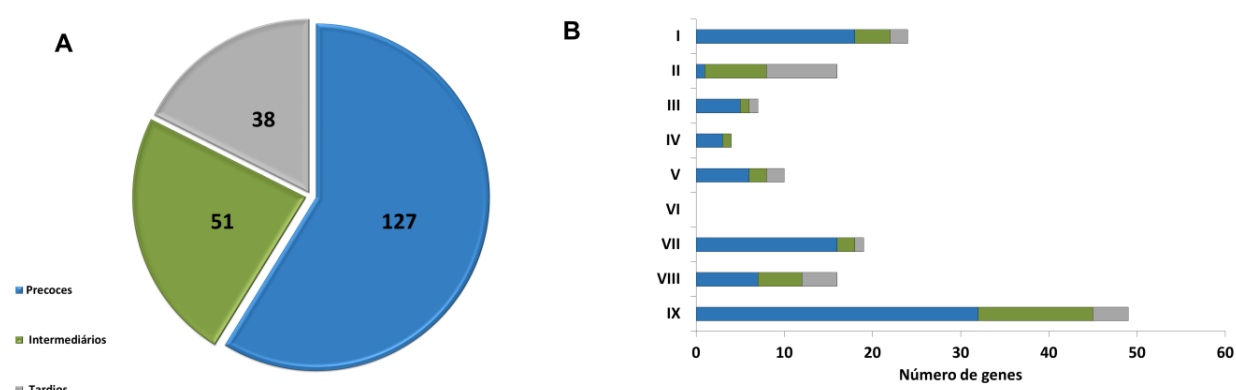


Figura 29. Análise de categorias funcionais e correlação com o perfil de expressão temporal de genes virais. A) Gráfico representando o número de genes do vaccinia vírus distribuídos em diferentes classes temporais (precoce, intermediário e tardio). B) Distribuição de genes de diferentes categorias funcionais em classes temporais de expressão gênica. Apenas genes com funções conhecidas são incluídos no gráfico. I, transcrição e processamento de RNA; II, estrutura e morfogênese do vírion; III, transdução de sinal; IV, metabolismo de nucleotídeos; V, replicação, recombinação e reparo de DNA; VI, tradução; VII, interação hospedeiro-vírus; VIII, outras funções metabólicas; IX, diversos.

4.2 Avaliação do transcriptoma do Frog virus 3 (*Iridoviridae*)

Dentre os NCLDV incluídos nesta análise, o frog virus 3 (FV-3) é o que possui o menor genoma, consequentemente com menos genes. Dos 91 genes analisados, 33 (36,3%) são classificados como precoces, 22 (24,2%) como intermediários e 36 (39,5%) como genes tardios (Figura 30 A). Metade dos genes do FV-3 não tem função conhecida. Doze genes estão envolvidos na replicação, recombinação e reparo do DNA, com 5 sendo classificados como intermediários e outros 5 genes como tardios (Figura 30B). Apenas três genes estão envolvidos com a transcrição e processamento de RNA, incluindo duas subunidades de RNA polimerase e fator de alongamento da transcrição S-II, todos classificados como genes intermediários. Nenhum gene envolvido na tradução ou interação vírus- hospedeiro foi observado (Figura 30B). É importante notar que a ausência de genes envolvidos na interação direta do hospedeiro, e apenas alguns envolvidos na regulação da transdução de sinal (2 genes iniciais, 4 genes tardios),

não implica que FV-3 tem apenas uma manipulação fraca da célula hospedeira.

Em vez disso, esses dados devem ser interpretados com cautela, dada a grande quantidade de genes ainda a serem caracterizados, e os genes envolvidos na manipulação do metabolismo do hospedeiro poderiam ser identificados em estudos posteriores. Curiosamente, a maioria dos genes envolvidos na estrutura do vírion, anotados como proteínas de superfície, são classificados como genes precoces ($9/17 = 53\%$), enquanto apenas 3 ($17,6\%$) genes são classificados como tardios (Figura 30B). Isso está em contraste com outros NCLDV, onde os genes envolvidos na estrutura do vírion e morfogenes são classificados principalmente como genes intermediários ou tardios. No entanto, o gene que codifica a proteína conservada do capsídeo principal é expresso tardiamente, como observado para outros NCLDVs.

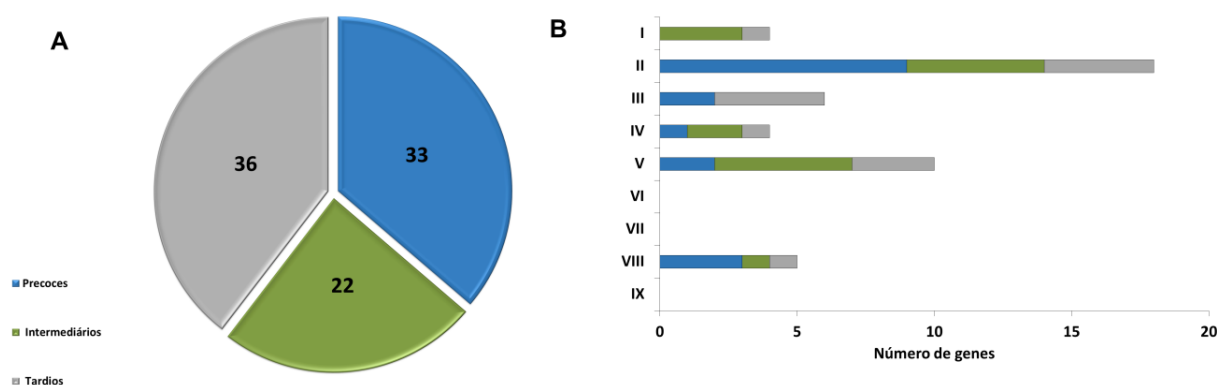


Figura 30. Análise de categorias funcionais e correlação com o perfil de expressão temporal de genes virais. A) Gráfico de representando o número de genes do Frog vírus 3 distribuídos em diferentes classes temporais (precoce, intermediário e tardio). B) Distribuição de genes de diferentes categorias funcionais em classes temporais de expressão gênica. Apenas genes com funções conhecidas são incluídos no gráfico. I, transcrição e processamento de RNA; II, estrutura e morfogênese do vírion; III, transdução de sinal; IV, metabolismo de nucleotídeos; V, replicação, recombinação e reparo de DNA; VI, tradução; VII, interação hospedeiro-vírus; VIII, outras funções metabólicas; IX, diversos.

4.3 Análise comparativa do transcriptoma de *Nucleocyotoviricota*

Dentre os quatro vírus incluídos nesta análise comparativa, podemos observar que exibem diferenças em muitos aspectos, incluindo estrutura viral, genoma e gama de hospedeiros. No entanto, muitos estudos evidenciam sua origem comum. Nossa análise indica que, apesar das diferenças na genética arsenal, genes envolvidos no mesmo processo biológico são geralmente expressos no mesmo fase do ciclo replicativo de um vírus. Uma divergência marcante são os genes relacionados a outras funções metabólicas, que se expressam em

diferentes fases dependendo do vírus. Isto pode ser devido ao relacionamento direto com o hospedeiro, onde o vírus manipularia o metabolismo do hospedeiro, que é específico para cada grupo de organismos eucarióticos. Estes genes virais foram possivelmente obtidos por transferência horizontal de genes (TGH) do hospedeiro ao longo da evolução, não seguindo um padrão de expressão semelhante.

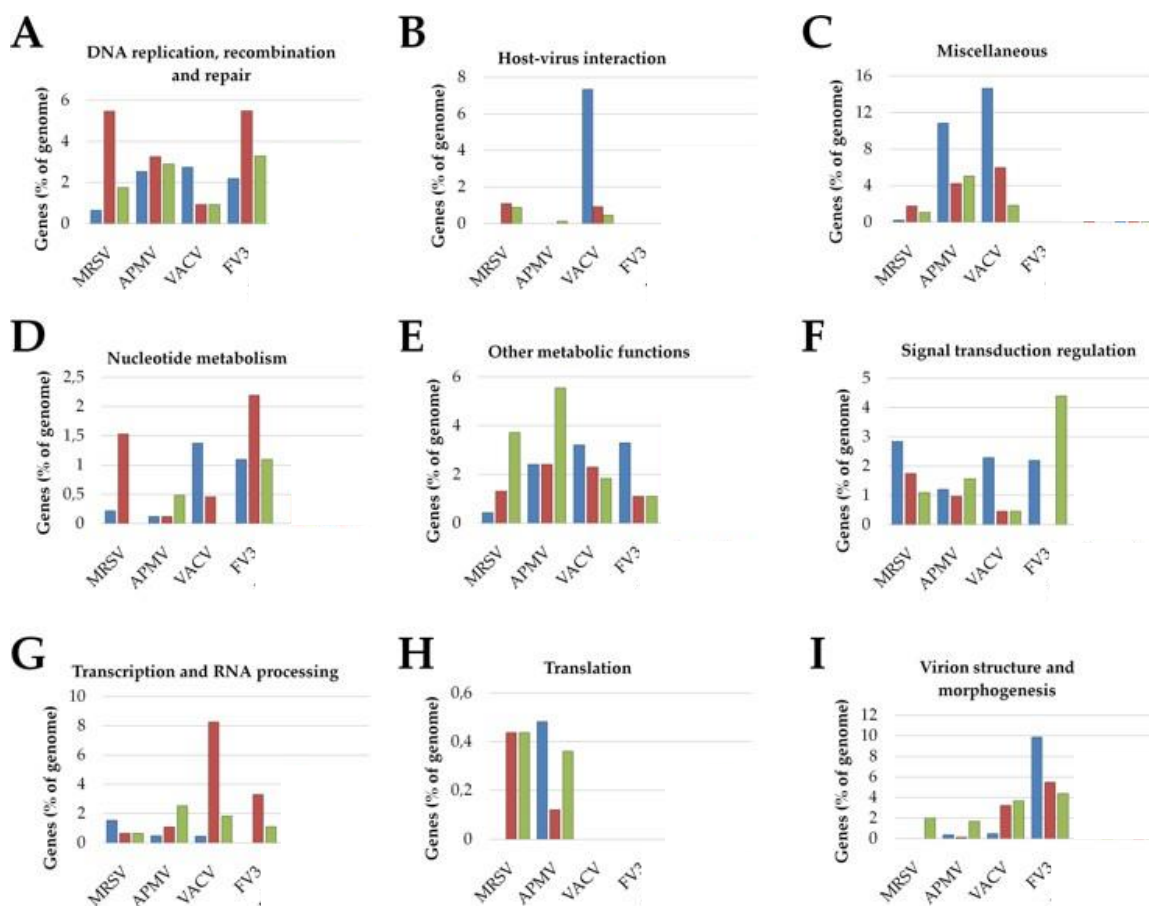


Figura 31. Análise comparativa de categorias funcionais e correlação com o perfil de expressão temporal de genes virais. A) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a Replicação, reparo e recombinação de DNA. B) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a interação vírus hospedeiro. C) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a genes diversos. D) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a metabolismo de nucleotídeo. E) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a outras funções metabólicas. F) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a transdução de sinal. G) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a transcrição. H) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a tradução. I) Gráfico do perfil de expressão de genes de MRSV, APMV, VACV e FV-3 relacionados a estrutura viral e morfogênese.

DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, os vírus gigantes têm diferenças notáveis em seus ciclos de replicação, bem como na estrutura de seus virions. Depois da descoberta deste grupo de vírus, estudos foram conduzidos para aumentar o conhecimento de sua biologia e interação com o hospedeiro por meio de investigações relacionadas ao ciclo de vida de esses organismos (ANDRADE et al., 2017; MUTSAFI et al., 2013; ARANTES et al., 2016). Este estudo apresenta um aprofundamento na descrição das etapas do ciclo de multiplicação do orpheovírus, fornecendo informações sobre a penetração, morfogênese, liberação, características estruturais e efeito citopático desencadeado por este vírus em suas células hospedeiras. Outros vírus gigantes são capazes de induzir mudanças morfológicas em *V. vermiformis*, desencadeando agregados de amebas denominados cachos, conforme descrito para o Tupanvirus (SILVA et al., 2019), e formação de unidades formadoras de placas evidenciadas para Faustovirus (BORGES et al., 2019), bem como arredondamento e lise celular.

As mudanças morfológicas desencadeadas pelo orpheovirus são diferentes daquelas anteriormente descritas, apresentando células com formas fusiformes e algumas células ramificadas. É sabido que a maioria dos vírus gigantes desencadeia o arredondamento da célula, o que impede a formação de pseudópodes e, conseqüentemente, diminui a motilidade das amebas. Curiosamente, além das mudanças morfológicas, foi observado um aumento na motilidade das células de *V. vermiformis*, nunca descrito anteriormente. Embora especulativo, uma hipótese é que este aumento da motilidade seria uma estratégia que facilitaria a infecção de células vizinhas, levando a um aumento da disseminação de partículas virais.

A estratégia de penetração por meio de fagocitose tem sido frequentemente descrita para outros vírus gigantes, demonstrado por meio de ensaios biológicos com inibidores farmacológicos para APMV e Cedratvirus getuliensis, nos quais foram observados uma considerável diminuição dos títulos virais (ANDRADE et al., 2017; SILVA et al., 2018). Considerando o fato de que as partículas de orpheovírus

apresentam grandes dimensões (900-1100 nm), foi proposto em estudos anteriores que a penetração das partículas ocorreria por fagocitose (ANDREANI et al., 2018).

Depois de analisar várias imagens MEV, foi observada a formação de pseudópodes em contato com partículas de orpheovírus na superfície das células hospedeiras. Devido a isso, reforçamos a hipótese de que a fagocitose seria como uma estratégia de penetração explorada, embora outros mecanismos como macropinocitose ou endocitose não devam ser descartados. Assim que ocorre a penetração nas células hospedeiras, o conteúdo interno da partícula é liberado no citoplasma da célula através de um ostíolo localizado em sua região apical. Este mecanismo também é descrito para outros vírus gigantes que têm partículas com morfologia semelhante e são filogeneticamente relacionados ao orpheovirus como cedratvírus (SILVA et al., 2018; LEGENDRE et al., 2014).

Ao contrário das FVs descritas para mimivírus, as quais apresentam zonas bem definidas (ANDRADE et al., 2017), as FVs visualizados durante as infecções por orpheovirus são grandes áreas elétron-lucentes localizadas em regiões perinucleares, onde a morfogênese de novas partículas ocorre. Diferente do observado anteriormente para os pandoravírus, o núcleo permanece durante a infecção viral (ANDRADE et al., 2018). Além disso, foi observado um recrutamento de mitocôndrias no interior e em regiões periféricas das FVs. O recrutamento de membranas também foi observado no interior das FVs. Desta forma, é sugerido ser uma característica importante para as fases de morfogênese e formação de vesículas para posterior exocitose de partículas. No entanto, a origem das membranas recrutadas precisa ser investigada.

Vesículas de *Marseillevirus* recentemente demonstraram consistir de membranas do retículo endoplasmático e, após o tratamento com inibidores, houve uma diminuição na formação de novas partículas e vesículas (ARANTES et al., 2016). Também para orpheovirus, observamos que o tratamento com brefeldina impacta a formação de FV e morfogênese. A morfogênese das partículas de orpheovirus ocorre no interior das FVs, iniciando com a formação de estruturas semicirculares elétron-densas denominadas crescentes. A formação dessas estruturas é descrita para outros vírus gigantes de amebas, bem como outros vírus pertencentes ao grupo NCLDV, como os poxvirus (MAURURI-AVIDAL et al., 2011). Essas crescentes tornam-se mais espessas e, ao longo do ciclo, são preenchidas com o conteúdo interno da partícula e se tornam mais elétron-densas até estarem completamente fechadas, ocorrendo assim a formação da partícula madura.

Embora as partículas de orpheovírus apresentem uma forma ovóide, semelhantes aos pandoravírus, cedratvírus e pithovírus, eles possuem uma estrutura distinta. Sendo assim, foi observado que as partículas de orpheovirus apresentam uma camada de fibrila que é menor em comparação com outros vírus gigantes, como mimivírus e, apesar das escassas informações sobre sua constituição, podem estar relacionadas à adesão na célula hospedeira, conforme demonstrado para mimivirus (RODRIGUES et al., 2015). Ao contrário do mimivírus, nenhuma área específica na qual fibrilas podem ser adquiridas foram observadas nas FVs durante infecção por orpheovírus e, portanto, formulamos a hipótese de que eles seriam adquiridos no interior das FVs (ANDRADE et al., 2017).

Além disso, foi observado que, além das fibrilas, as partículas são constituídas por diversas camadas, sendo uma camada externa à camada do capsídeo e uma membrana interna que envolve o cerne da partícula. Para melhor entendimento de sua estrutura, mais ensaios são necessários não somente para compreensão da origem das membranas presentes em sua estrutura, como também trazer mais informações que reforcem os mecanismos utilizados pelo vírus em etapas iniciais do ciclo de multiplicação.

A presença de uma ou mais partículas envolvidas por membranas são descritas para Cedratvirus getiliensis e Pithovirus sibericum, sugerindo que eles seriam liberados da célula hospedeira por exocitose (SILVA et al., 2018; LEGENDRE et al., 2014). Embora a lise celular tenha sido demonstrada por imagens MEV, e é descrita como a estratégia principal para a liberação da progênie viral, acredita-se que a exocitose seria um mecanismo alternativo usado pelo orpheovírus. Um significativo aumento na contagem de partículas do sobrenadante foi observado 12 h.p.i., sem diminuição nas contagens de células. Além disso, por imagens de microscopia IF ao longo do ciclo, foi visualizado um aumento no número de partículas fora das células também 12 h.p.i. e 24 h.p.i., respectivamente.

Os ensaios de curva de ciclo único demonstraram um aumento nos títulos virais 12 h.p.i. e aumento da amplificação do genoma viral 9 h.p.i., atingindo um patamar 48 h.p.i. para ambos os casos. Esses dados corroboram com o proposto anteriormente (ANDREANI et al., 2018), o qual descreveram um ciclo de multiplicação mais longo com duração de aproximadamente 30 h. Estudos que avaliaram ciclo de multiplicação de outros vírus gigantes, como como Tupanvirus, kaumobavirus e Faustovirus, capazes de infectar *V. vermiformis* também demonstraram ciclos de multiplicação de maior duração (SILVA et al., 2019; BAJRAI et al., 2016; RETENO et al., 2015) em comparação a vírus gigantes associados a amebas do gênero

Acanthamoeba. Isso sugere que o perfil de duração do ciclo de multiplicação desses vírus pode estar relacionado à seus hospedeiros. De modo geral, este trabalho traz informações valiosas em relação ao ciclo de multiplicação, estrutura e efeito citopático desencadeado pelo orpheovírus. Desta forma, contribuindo para potencializar a compreensão sobre este novo vírus gigante. Estudos futuros com a aplicação de métodos alternativos incluindo inibidores de macropinocitose, endocitose, criomicroscopia, ensaios IF com marcadores para compreensão da origem das membranas estruturais da partícula, ajudarão a preencher algumas lacunas.

Além de informações sobre a biologia e aspectos do ciclo de multiplicação dos vírus pertencentes ao filo *Nucleocytoviricota* serem necessárias, muitos aspectos relacionados ao perfil transcricional destes vírus ainda não estão completamente elucidados. Desta forma, compreender de forma mais aprofundada como estes mecanismos ocorrem nos fornecem também informações sobre sua interação com hospedeiro e nos permitem inferir sobre sua história evolutiva.

Muitos conceitos sobre a virosfera foram alterados com estudos realizados ao longo dos anos após a descoberta dos NCLDV's. Esse grupo se caracteriza por compartilhar muitos genes relacionados à replicação do genoma e à formação da estrutura viral, denominados "*viral hallmark genes*", além de um padrão genético transcricional comum (KOONIN et al., 2020). Essas características combinadas reforçam o monofiletismo desse grupo. Além disso, muitos membros desse grupo têm um aparato transcricional quase completo, que fornece alguma independência do maquinário de seus hospedeiros. Assim, a presença de um aparato transcricional robusto tem levantado muita discussão sobre os aspectos evolutivos desses vírus e seu genoma.

Neste trabalho, foi realizada uma análise comparativa de grupos de genes expressos em diferentes momentos de infecção de diferentes membros dos NCLDV's. Observou-se como característica comum a este grupo um perfil temporal de expressão de seus genes ao longo do ciclo de multiplicação, característica que aparentemente se manteve ao longo da evolução deste grupo de vírus. Ressaltando esta característica em comum, é possível que uma fração dos genes classificados como precoces em alguns dos membros dos NCLDV sejam transportados na partícula ao citoplasma da célula hospedeira, como demonstram dados preliminares, os quais identificaram transcritos no interior do capsídeo de marseillevírus (BOYER et al., 2009). Mesmo assim, análises mais aprofundadas são necessárias para melhor compreensão deste aspecto.

Genes pertencentes a classes temporais distintas apresentam como padrão esperado seu pico de expressão em momentos distintos de infecção. Desta forma, pôde-se notar que genes relacionados à tradução e morfogênese tiveram seu pico de expressão principalmente em momentos tardios em quase todos os NCLDV analisados. Diferentemente dos genes descritos anteriormente, genes envolvidos em replicação, reparo e recombinação de DNA foram observados sendo expressos em diferentes momentos do ciclo de multiplicação dos vírus estudados. Este perfil demonstra a importância destes genes ao longo de todo o ciclo de multiplicação, sendo alguns utilizados no início do ciclo, e outros posteriormente cujos produtos podem ser encapsidados ao final do ciclo e encontrados no interior de partículas maduras de alguns NCLDV, como no caso da DNA polimerase descrito anteriormente para *Marseillevirus* (BOYER et al., 2009). Finalmente, apesar de um padrão comum de expressão temporal gênica dos vírus analisados ser observado, sendo uma característica possivelmente herdada do último ancestral comum dos *Nucleocytoviricota*, é mais provável que cada grupo viral tivesse uma história diferente de ganho e perda de gene (FILÉE et al., 2015), possivelmente devido a uma interação com distintos hospedeiros e organismos simpátricos, resultando em diferentes proporções de categorias funcionais de genes ortólogos.

Entender como os genes de um determinado patógeno são expressos fornece dados que auxiliam no entendimento de sua biologia e na interação com seus hospedeiros. Além disso, informações sobre a regulação da expressão desses genes também podem auxiliar em estudos com o objetivo de interromper esse processo em um determinado ponto do ciclo, a fim de contribuir para a resolução de possíveis doenças causadas por diferentes patógenos virais.

Por fim, este estudo compila informações sobre a regulação da expressão gênica de diferentes patógenos que abre campo para estudos de transcrição de outros vírus pertencentes a NCLDVs, cujo processo ainda não está completamente elucidado. A análise apresentada aqui fornece informações sobre os perfis de expressão gênica de outros patógenos virais pertencentes à *Nucleocytoviricota* e pode ser usada como um ponto de partida para futuras investigações transcriptômicas.

CONCLUSÕES

I. Caracterização do ciclo de multiplicação do orpheovírus em *Vermamoebavermiformis*

- Infecção pelo orpheovírus desencadeia mudanças morfológicas na célula hospedeira e efeito citopático nunca antes descrito em *V. vermiformis*;
- Após internalização de partículas através de fagocitose e liberação do genoma no citoplasma celular são formadas grandes FV elétron-lucentes;
- No interior das FV ocorre a morfogênese que se inicia com a formação de crescentes, as quais se estendem e são preenchidas com seu conteúdo interno até a formação de partículas maduras;
- As partículas maduras são formadas por diversas camadas e são liberadas das células hospedeiras através de lise ou exocitose.

II. Análise comparativa do transcriptoma de *nucleocytoviricota*

- Com análise de genes transcritos em tempos precoces, intermediários e tardios foi possível observar um padrão comum de função relacionada à transdução de sinal, transcrição, replicação do DNA em tempos precoces e relacionados a morfogênese em tempos tardios entre os quatro vírus pertencentes ao grupo dos NCLDV analisados;
- Como padrão comum observado dentre os vírus analisados a expressão de seus genes ao longo do ciclo de multiplicação é regulada temporalmente, sendo uma característica que se manteve durante sua história evolutiva;
- Apesar de um padrão comum de expressão temporal gênica dos vírus analisados ser observado, sendo uma característica possivelmente herdada do último ancestral comum dos *Nucleocytoviricota*, é mais provável que cada grupo viral tivesse uma história diferente de ganho e perda de gene.

REFERÊNCIAS

- ABEDKHOJASTEH, Hoda et al. First report of Hartmannella keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. **Iranian journal of parasitology**, v. 8, n. 3, p. 481, 2013.
- ABERGEL, Chantal et al. Virus-encoded aminoacyl-tRNA synthetases: structural and functional characterization of mimivirus TyrRS and MetRS. **Journal of virology**, v. 81, n. 22, p. 12406-12417, 2007.
- ABRAHÃO, Jônatas et al. Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. **Nature communications**, v. 9, n.1, p. 749, 2018.
- ABRAHÃO, Jônatas S. et al. Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 120, 2014.
- AHERFI, Sarah et al. A large open pangenome and a small core genome for giant pandoraviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1486, 2018.
- AHERFI, Sarah et al. Complete genome sequence of Cannes 8 virus, a new member of the proposed family “Marseilleviridae”. **Virus Genes**, v. 47, n. 3, p. 550- 555, 2013.
- AHERFI, Sarah et al. Giant viruses of amoebas: an update. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 349, 2016.
- AHERFI, Sarah et al. The expanding family Marseilleviridae. **Virology**, v. 466, p. 27- 37, 2014.
- AITKEN, Dorothy et al. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed Vahlkampfia and Hartmannella infection. **Ophthalmology**, v. 103, n. 3, p. 485-494, 1996.
- ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira et al. Filling knowledge gaps for mimivirus entry, uncoating, and morphogenesis. **Journal of virology**, v. 91, n. 22, p. e01335-17, 2017.
- ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira et al. New isolates of pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. **Journal of virology**, v. 93, n. 5,p. e01942-18, 2019.
- ANDREANI, Julien et al. Cedratvirus, a double-cork structured giant virus, is a distant relative of pithoviruses. **Viruses**, v. 8, n. 11, p. 300, 2016.
- ANDREANI, Julien et al. Orpheovirus IHUMI-LCC2: a new virus among the giant viruses. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2643, 2018.
- ANDREANI, Julien et al. Pacmanvirus, a new giant icosahedral virus at the crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. **Journal of virology**, v. 91, n. 14, p. e00212-17, 2017.
- ANTWERPEN, M. H. et al. Whole-genome sequencing of a pandoravirus isolated from

keratitis-inducing acanthamoeba. **Genome announcements**, v. 3, n. 2, p. e00136-15, 2015.

ARANTES, Thalita Souza et al. The large Marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. **Journal of virology**, v. 90, n. 11, p. 5246-5255, 2016.

ARSLAN, Defne et al. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17486-17491, 2011.

ASGARI, Sassan et al. ICTV virus taxonomy profile: Ascoviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 1, p. 4, 2017.

ASSARSSON, Erika et al. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2140-2145, 2008.

BAJRAI, Leena H. et al. Kaumoebavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. **Viruses**, v. 8, n. 11, p. 278, 2016.

BAJRAI, Leena Hussein et al. Isolation of Yasminevirus, the first member of Klosneuvirinae isolated in coculture with *Vermamoeba vermiformis*, demonstrates an extended arsenal of translational apparatus components. **Journal of virology**, v. 94, n. 1, 2019.

BELHAOUARI, Djamal et al. Evidence of a Cellulosic Layer in Pandoravirus massiliensis Tegument and the Mystery of the Genetic Support of Its Biosynthesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2932, 2019.

BERTELLI, Claire et al. Cedratvirus lausannensis—digging into Pithoviridae diversity. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 10, p. 4022-4034, 2017.

BORGES, Iara et al. Trapping the enemy: *Vermamoeba vermiformis* circumvents Faustovirus mariensis dissemination by enclosing viral progeny inside cysts. **Journal of virology**, v. 93, n. 14, p. e00312-19, 2019.

BOUGHALMI, Mondher et al. High-throughput isolation of giant viruses of the Mimiviridae and Marseilleviridae families in the Tunisian environment. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2000-2007, 2013.

BLANC, Guillaume et al. Deep RNA sequencing reveals hidden features and dynamics of early gene transcription in *Paramecium bursaria* chlorella virus 1. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90989, 2014.

BOYER, Mickaël et al. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 51, p. 21848-21853, 2009.

CAMPOS, Rafael K. et al. Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 95, 2014.

CHINCHAR, V. Gregory et al. ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 5, p. 890-891, 2017.

CHRISTO-FOROUX, Eugene et al. Characterization of Mollivirus kamchatka, the first modern representative of the proposed Molliviridae family of giant viruses. **Journal of Virology**, v. 94, n. 8, 2020.

COHEN, Gaelle et al. Ameba-associated keratitis, France. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 7, p. 1306, 2011.

COLSON, Philippe et al. “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. **Archives of virology**, v. 158, n. 12, p. 2517- 2521, 2013.

COLSON, Philippe et al. Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales. **Intervirology**, v. 55, n. 5, p. 321-332, 2012.

COLSON, Philippe et al. Viruses with more than 1,000 genes: Mamavirus, a new Acanthamoeba polyphagomimivirus strain, and reannotation of Mimivirus genes. **Genome biology and evolution**, v. 3, p. 737-742, 2011.

DELAFONT, Vincent et al. Vermamoeba vermiformis: a free-living amoeba of interest. **Microbial ecology**, v. 76, n. 4, p. 991-1001, 2018.

DORNAS, Fábio P. et al. A Brazilian Marseillevirus is the founding member of a lineage in family Marseilleviridae. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 76, 2016.

DORNAS, Fábio P. et al. Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1086, 2015.

DOS SANTOS, Raíssa Nunes et al. A new marseillevirus isolated in Southern Brazil from Limnoperna fortunei. **Scientific reports**, v. 6, p. 35237, 2016.

DOUTRE, Gabriel et al. Genome analysis of the first Marseilleviridae representative from Australia indicates that most of its genes contribute to virus fitness. **Journal of virology**, v. 88, n. 24, p. 14340-14349, 2014.

FILÉE, Jonathan. Route of NCLDV evolution: the genomic accordion. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 5, p. 595-599, 2013.

FISCHER, Matthias G. et al. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 45, p. 19508-19513, 2010.

FISCHER, Matthias G. et al. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 45, p. 19508-19513, 2010.

GALINDO, Inmaculada; ALONSO, Covadonga. African swine fever virus: a review.

Viruses, v. 9, n. 5, p. 103, 2017.

KHAN, Naveed Ahmed. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 4, p. 564-595, 2006.

KHEZRI, Aram et al. Molecular and morphometric characterization of Acanthamoeba spp. from different water sources of Northwest Iran as a neglected focus, co- bordered with the country of Iraq. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 11, 2016.

KOONIN, Eugene V. et al. Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, 2020.

KOT, Karolina; LANOCHA-ARENDARCZYK, N. A.; KOSIK-BOGACKA, Danuta I. Amoebas from the genus Acanthamoeba and their pathogenic properties. **Ann. Parasitol**, v. 64, p. 299-308, 2018.

KRÓL-TURMIŃSKA, Katarzyna; OLENDER, Alina. Human infections caused by free-living amoebae. **Ann Agric Environ Med**, v. 24, n. 2, p. 254-260, 2017.

KROON, Erna Geessien et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. **Antiviral research**, v. 92, n. 2, p. 150-163, 2011.

LA SCOLA, Bernard et al. A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2033-2033, 2003.

LAGIER, J.-C. et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 12, p. 1185-1193, 2012.

LEGENDRE, Matthieu et al. Breaking the 1000-gene barrier for Mimivirus using ultra-deep genome and transcriptome sequencing. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 99, 2011.

LEGENDRE, Matthieu et al. Diversity and evolution of the emerging Pandoraviridae family. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

LEGENDRE, Matthieu et al. In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y- old giant virus infecting Acanthamoeba. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. E5327-E5335, 2015.

LEGENDRE, Matthieu et al. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome research**, v. 20, n. 5, p. 664-674, 2010.

LEGENDRE, Matthieu et al. Pandoravirus celtis illustrates the microevolution processes at work in the giant Pandoraviridae genomes. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 430, 2019.

LEGENDRE, Matthieu et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4274-4279, 2014.

LEVASSEUR, Anthony et al. Comparison of a modern and fossil Pithovirus reveals its

genetic conservation and evolution. **Genome biology and evolution**, v. 8, n. 8, p. 2333-2339, 2016.

LOUAZANI, Amina Cherif et al. Genome sequences of new Faustovirus strains st1 and lc9, isolated from the South of France. **Genome Announc.**, v. 5, n. 28, p. e00613-17, 2017.

LWOFF, A. The concept of virus. **J Gen Microbiol.**v.17(2). p.239-53. 1957.

MAJJI, Sai et al. Transcriptome analysis of Frog virus 3, the type species of the genus Ranavirus, family Iridoviridae. **Virology**, v. 391, n. 2, p. 293-303, 2009.

MARURI-AVIDAL, Liliana; WEISBERG, Andrea S.; MOSS, Bernard. Vaccinia virus L2 protein associates with the endoplasmic reticulum near the growing edge of crescent precursors of immature virions and stabilizes a subset of viral membrane proteins. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12431-12441, 2011.

MUTSAFI, Yael et al. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5978-5982, 2010.

OLIVEIRA, Grazielle Pereira et al. Poxvirus host range genes and virus–host spectrum: a critical review. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 331, 2017.

OLIVEIRA, Grazielle Pereira et al. Promoter motifs in NCLDV: an evolutionary perspective. **Viruses**, v. 9, n. 1, p. 16, 2017.

OVRUTSKY, Alida R. et al. 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, Isabelle et al. Isolation of Vermamoeba vermiformis and associated bacteria in hospital water. **Microbial pathogenesis**, v. 80, p. 14-20, 2015.

PHILIPPE, Nadège et al. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. **Science**, v. 341, n. 6143, p. 281-286, 2013.

POPGEORGIEV, Nikolay et al. Marseillevirus-like virus recovered from blood donated by asymptomatic humans. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n.7, p. 1042-1050, 2013.

RAOULT, Didier et al. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. **Science**, v. 306, n. 5700, p. 1344-1350, 2004.

RAOULT, Didier; SCOLA, Bernard La; BIRTLES, Richard. The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 95-102, 2007.

REED, Lowell Jacob; MUENCH, Hugo. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American journal of epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938. OLIVEIRA, Grazielle et al. Tupanvirus-infected amoebas are induced to aggregate with uninfected cells promoting viral dissemination. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

RETENO, Dorine Gaëlle et al. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giantviruses infecting amoebae. **Journal of virology**, v. 89, n. 13, p. 6585-6594, 2015.

RODRIGUES, Rodrigo Araújo Lima et al. “Tupanvirus”, a new genus in the family Mimiviridae. **Archives of virology**, v. 164, n. 1, p. 325-331, 2019.

RODRIGUES, Rodrigo Araújo Lima et al. Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. **Journal of virology**, v. 89, n. 23, p. 11812-11819, 2015.

ROHR, Ute et al. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1822- 1824, 1998.

SAADI, Hanene et al. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. e127-e134, 2013a.

SAADI, Hanene et al. Shan virus: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. **Intervirolgy**, v. 56, n. 6, p. 424-429, 2013b.

SILVA, Lorena et al. Microscopic analysis of the tupanvirus cycle in vermamoeba vermiformis. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 671, 2019.

SILVA, Ludmila Karen et al. Cedratvirus getuliensis replication cycle: an in-depth morphological analysis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

TAKEMURA, Masaharu. Draft genome sequence of Tokyovirus, a member of the family Marseilleviridae isolated from the Arakawa River of Tokyo, Japan. **Genome announcements**, v. 4, n. 3, p. e00429-16, 2016.

TAWFEEK, Gihan Mostafa et al. Genotypic, physiological, and biochemical characterization of potentially pathogenic Acanthamoeba isolated from the environment in Cairo, Egypt. **Parasitology research**, v. 115, n. 5, p. 1871-1881, 2016.

TEMMAM, Sarah et al. Faustovirus-like asfarvirus in hematophagous biting midges and their vertebrate hosts. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1406, 2015.

THOMAS, Vincent et al. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1454-1466, 2011.

VAN ETTEN, James L.; LANE, Leslie C.; DUNIGAN, David D. DNA viruses: the really big ones (giruses). **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 83-99, 2010.

VAN ETTEN, James L.; MEINTS, Russel H. Giant viruses infecting algae. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 447-494, 1999.

VISVESVARA, Govinda S.; MOURA, Hercules; SCHUSTER, Frederick L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1,

p. 1-26, 2007.

WILSON, W. H.; VAN ETTEN, James L.; ALLEN, M. J. The Phycodnaviridae: the story of how tiny giants rule the world. In: **Lesser Known Large dsDNA Viruses**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 1-42.

XIAO, Chuan et al. Structural studies of the giant mimivirus. **PLoS biology**, v. 7, n.4, p. e1000092, 2009.

YOOSUF, Niyaz et al. Complete genome sequence of Courdo11 virus, a member of the family Mimiviridae. **Virus Genes**, v. 48, n. 2, p. 218-223, 2014.

YOOSUF, Niyaz et al. Related giant viruses in distant locations and different habitats: Acanthamoeba polyphaga moumouvirus represents a third lineage of the Mimiviridae that is close to the megavirus lineage. **Genome biology and evolution**, v. 4, n. 12, p. 1324-1330, 2012.

YOSHIKAWA, Genki et al. Medusavirus, a novel large DNA virus discovered from hot spring water. **Journal of virology**, v. 93, n. 8, p. e02130-18, 2019.

YUTIN, Natalya et al. Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology journal**, v. 6, n. 1, p. 223, 2009.

ZAGHLOUL, Heba AH et al. Transcriptome analysis of the Spodoptera frugiperda ascovirus in vivo provides insights into how its apoptosis inhibitors and caspase promote increased synthesis of viral vesicles and virion progeny. **Journal of virology**, v. 91, n. 23, p. e00874-17, 2017.

ANEXO I. Trabalhos publicados ou em análise relacionados à tese

RESEARCH

Open Access

In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus



Fernanda Souza¹, Rodrigo Rodrigues¹, Erik Reis¹, Maurício Lima¹, Bernard La Scola^{2,3} and Jônatas Abrahão^{1*}

Abstract

Background: After the isolation of *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), the study and search for new giant viruses has been intensified. Most giant viruses are associated with free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba*; however other giant viruses have been isolated in *Vermamoeba vermiformis*, such as Faustovirus, Kaumobavirus and Orpheovirus. These studies have considerably expanded our knowledge about the diversity, structure, genomics, and evolution of giant viruses. Until now, there has been only one Orpheovirus isolate, and many aspects of its life cycle remain to be elucidated.

Methods: In this study, we performed an in-depth characterization of the replication cycle and particles of Orpheovirus by transmission and scanning electron microscopy, optical microscopy and IF assays.

Results: We observed, through optical and IF microscopy, morphological changes in *V. vermiformis* cells during Orpheovirus infection, as well as increased motility at 12 h post infection (h.p.i.). The viral factory formation and viral particle morphogenesis were analysed by transmission electron microscopy, revealing mitochondria and membrane recruitment into and around the electron-lucent viral factories. Membrane traffic inhibitor (Brefeldin A) negatively impacted particle morphogenesis. The first structure observed during particle morphogenesis was crescent-shaped bodies, which extend and are filled by the internal content until the formation of multi-layered mature particles. We also observed the formation of defective particles with different shapes and sizes. Virological assays revealed that viruses are released from the host by exocytosis at 12 h.p.i., which is associated with an increase of particle counts in the supernatant.

Conclusions: The results presented here contribute to a better understanding of the biology,

Background

Giant viruses belong to a complex group of viruses commonly referred to as nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDVs). The group gained notoriety after the isolation of *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), which has large particles (~ 750 nm) capable of infecting amoebae of the genus *Acanthamoeba* [1]. The study and search for new giant viruses has been intensified, and these viruses were uncovered in different samples and environments, considerably expanding our knowledge about their diversity and ubiquity [2, 3]. Most

giant viruses such as Mimivirus, Marseillevirus, Pandoravirus and Cedratvirus are associated with free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba*; however, other giant viruses have been isolated in *Vermamoeba vermiformis*, such as Faustovirus and Kaumobavirus [4, 5].

In 2018, a new virus, Orpheovirus IHUMI-LCC2 (hence forward called Orpheovirus), was described that is capable of infecting *V. vermiformis*, which was isolated from rat faecal samples collected in France. These viruses have ovoid-shaped particles, as observed for Cedratvirus, Pandoravirus, and Pithovirus, ranging from 900 to 1100 nm in length and approximately 500 nm in diameter. These viruses are also marked by the presence of a circular double-stranded DNA genome of 1,473,573 bp, encoding 1512 predicted genes of which 57.5% are ORFs [6]. Regarding the predicted

* Correspondence: jonatas.abrahao@gmail.com

¹Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



genes, it was observed that the best hits were with Pitho- virus sibericum, Pithovirus massiliensis and Cedratvirus A11. Furthermore, pan-genomic analysis and phylogenetic reconstructions based on different core genes demonstrated a distant relationship between Orpheovirus and pitho- viruses and cedratviruses [6].

Due to its large size, it was proposed that the replication cycle of Orpheovirus was initiated by phagocytosis of viral particles by *V. vermiformis* cells. After particle entry, the genome would be released into the cell cytoplasm through an ostiole located at the apex of the virion. An eclipse phase is established, and then viral factories (VFs) are formed, where new viral particles are assembled. In the final steps of the cycle, the cell cytoplasm is completely filled by new synthesized particles, which are released from the host cell by lysis [6]. Despite the information described in the first proposed model, many steps of the replication cycle and particles of this virus still need to be elucidated.

In the present work, we present an in-depth investigation of the steps of the replication cycle of Orpheovirus. Our data revealed that Orpheovirus induces profound changes in the morphology of *V. vermiformis*, including increased cell motility at some time points of infection. We also provide details about virus entry, VFs formation, organelle recruitment and particle morphogenesis. We also observe that viral particles are released from infected cells both by exocytosis and cell lysis. The data presented here reveal several peculiar characteristics of the life cycle, structure and host interaction of this new giant virus.

Methods

Cell culture, viral production, purification and titration

V. vermiformis (ATCC CDC19) were cultivated in Peptone Yeast Extract Glucose (PYG) medium supplemented with 0.14 mg/mL penicillin (Sigma-Aldrich, USA), 50 mg/mL gentamicin (Thermo Fisher Scientific, USA), and 2.5 mg/mL amphotericin (Bristol-Myers Squibb, New York, USA) at 32 °C. For Orpheovirus production and purification, ten T175 cm² flasks (Thermo Fisher Scientific, USA) containing 20×10^6 cells in PYG medium were infected with Orpheovirus at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 0.01 and incubated for 4 days at 32 °C. The lysate was centrifuged at $1200 \times g$ to remove cell debris. Then, the supernatant was collected, added over a 40% sucrose (Merck, Germany) cushion and centrifuged at $36,000 \times g$ for 1 h. The pellet was re-suspended in PBS and stored at -20 °C. Three aliquots of the virus stock were titrated to the 50% end-point and calculated by the Reed-Muench method [7, 8].

Cytopathic effect, one-step growth curve assays and particle counts

To investigate the cytopathic effect (CPE) of Orpheovirus in *V. vermiformis* cells by optical microscopy, 25

cm² cell culture flasks containing 3×10^6 *V. vermiformis* cells were infected with Orpheovirus at an M.O.I. of 10, incubated at 32 °C and observed at different hours post infection (h.p.i) (1, 3, 6, 9, 12 and 24 h.p.i) for 24 h. Uninfected *V. vermiformis* cells (control) were also observed. A one-step growth curve was constructed using 25 cm² flasks in duplicate at an M.O.I. of 10. At different time points (1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72 h.p.i), the infected *V. vermiformis* cells and supernatants were collected, titred and calculated using the end point method. We also performed a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay to quantify the viral genome load targeting the DNA polymerase gene, using oligonucleotide primer sequences Forward 5'-ATGGCGAAATATGCGGAAGGG-3' and Reverse 5'-TCTTGTGCTCCTAACGCACC-3'. The thermal cycling conditions used were: one cycle at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60 °C for 40 s; a melting curve analysis at 95 °C for 15 s, 58 °C for 15 s and a final cycle at 95 °C for 15 s was completed.

To investigate if the particles were released from the host cell by exocytosis, 3×10^6 *V. vermiformis* cells were infected with Orpheovirus at an M.O.I. of 5 and analyses were carried out at the infection times of 3, 6, 9, 12 and 24 h.p.i. Thirty minutes after infection, the monolayer of cells was washed once with PBS and the flasks were filled with 4 mL of PYG medium. After each time point, we separated 12 µL of the supernatant to count the number of released Orpheovirus particles during infection. The particles were observed by light microscopy (Olympus BX41, Japan) under 1000x magnification using a cell counting chamber (Kcell Olen Kasvi, Brazil).

Transmission and scanning electron microscopy

For the transmission electron microscopy (TEM) assays, the cells were infected at an M.O.I. of 0.01, and when the CPE was observed, we centrifuged the flask content for 10 min at $800 \times g$. The pellet was washed twice with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer for at least 1 h at room temperature. The pellet was then washed twice with 0.1 M sodium phosphate buffer and suspended in the same solution. After, the amoebae were embedded in EPON resin using a standard method, as follows: 2 h of fixation in 2% osmium tetroxide, five washes in distilled water, overnight incubation in uranyl acetate 2% at 2-8 °C, two washes in distilled water, 10 min dehydration in increasing ethanol concentrations (35, 50, 70, 85, 95 and 100%), 20 min incubation in acetone and embedding in EPON resin. Ultrathin sections were subsequently analysed under TEM (Spirit Biotwin FEI-120 kV) at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil.

For the scanning electron microscopy (SEM) assays, the cells infected at an M.O.I. of 0.01 were added to round glass blades covered by poly-L-lysine and fixed

with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at room temperature. Samples were then washed three times with 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed with 1.0% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. After a second fixation, the samples were washed three times with 0.1 M cacodylate buffer and immersed in 0.1% tannic acid for 20 min. Samples were then washed in cacodylate buffer and dehydrated by serial passages in ethanol solutions with concentrations ranging from 35 to 100%. They were dried at the critical CO₂ point, transferred onto stubs and metalized with a 5 nm gold layer. The analyses were completed with SEM (FEG Quanta 200 FEI) at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil.

Immunofluorescence assays

For immunofluorescence (IF) analysis, 3×10^5 *V. vermiformis* cells were added to round glass blades and after incubation during 24 h at 32 °C, the cells were infected at an M.O.I. of 2. After 1, 3, 6, 8, 12 and 24 h.p.i., we fixed with acetone for 10 min at -20 °C. After fixation, cells were stained with polyclonal anti-orpheovirus whole particle antibodies produced in mouse (1:400 diluted in PBS) for 1 h at 37 °C, followed by three rinses with PBS. Cells were then incubated with 3% bovine serum albumin (BSA)-PAS for 30 min, followed by three rinses with PBS. After a 1 h of incubation with anti-mouse secondary antibodies (1:400 diluted in PBS), followed by three rinses with PBS, the cells were also incubated with DAPI Sigma (1:1000 diluted in PBS) for 1 h at room temperature. After three rinses with PBS, the cells were incubated with rodamine-phalloidine (Invitrogen) (1:1000 diluted in PBS) for 1 h at room temperature. Uninfected cells (control) were also fixed and prepared as described above. Fluorescently labelled cells were observed using an Axio Imager Z2-Apoptome 2 microscope (Zeiss). The Zen Lite software from Zeiss microscopy was used for image processing at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil.

Membrane inhibitor assays

To evaluate the role of cell membranes in the viral replication cycle, 14×10^5 *V. vermiformis* cells were infected with Orpheovirus at an M.O.I. of 5. Thirty minutes post-infection, the amoebae were washed with PAS and then we added 15 mL of PYG medium maintained at 32 °C. After 1 h, Brefeldin A (BFA), an inhibitor of membrane traffic, was added at a final concentration of 10 µM, and at 8 h post-infection, the amoebae were collected for TEM analysis. Samples were prepared for microscopy as previously described.

Results

Characterization of cytopathic effect of Orpheovirus evidenced morphological changes and increased motility of *V. vermiformis*

In order to characterize the CPE of Orpheovirus, *V. vermiformis* cells were infected at M.O.I. of 10 and observed up

to 24 h.p.i.. Using optical microscopy, we observed that the cells became stretched into a fusiform shape at 3 h.p.i., and this effect became more evident at 9 h.p.i. and 12 h.p.i., respectively (Fig. 1a). In addition, at 12 h.p.i., some branched fusiform cells were observed (Fig. 1a). At 24 h.p.i., the cells became rounded, cell lysis was more evident and some fusiform cells were visualized (Fig. 1a). We also performed counts of normal (typical morphology of control cells), fusiform (branched and not branched) and rounded cells. We observed a decrease of normal cells, while fusiform cell counts increased at 9 h.p.i., composing ~40% of the total infected cells. At 24 h.p.i., most cells were rounded, but some fusiform cells were also observed (~20%) (Fig. 1b).

Different time points during infection (M.O.I. of 5) were selected for IF assay. IF assays using anti-orpheovirus primary antibodies at 1 h.p.i. revealed particles being endocytosed by amoebae (Fig. 2). At 3 h.p.i. and 6 h.p.i., respectively, an increase in particle amounts were visualized within the host cells. We also visualized fusiform cells at 12 h.p.i. by IF, and interestingly, we noticed viral particle polarization at one cell extremity and an increasing number of particles outside cells (Fig. 2). At 24 h.p.i., many cells were rounded and the large majority of amoebae were already lysed (Fig. 2). The CPE triggered by Orpheovirus is different from others previously described for Faustovirus, which revealed the formation of plaque forming units, and Tupanvirus, which was characterized by amoebae aggregates called bunches, as well as rounding and lysis in *V. vermiformis* [9, 10]. Furthermore, we observed that Orpheovirus infection induces an increase in the motility of

V. vermiformis cells, especially those with a fusiform shape. This effect starts at 6 h.p.i. and became more evident at 12 h.p.i. (Additional file 1: Video S1)

Orpheovirus is phagocytized, forms electron-lucent viral factories and induce cytoplasmic changes involving different organelles

Due to the large size of Orpheovirus particles (~1.1 µm), it was proposed that their entry into *V. vermiformis* cells would occur by phagocytosis, as previously described for other giant viruses, such as Pandoravirus, Mimivirus and Cedratvirus [3, 11, 12]. During early steps of the replication cycle, we visualized, by SEM, the formation of pseudopods in contact with Orpheovirus particles at the cell surface (Fig. 3a). This suggests that phagocytosis is the entry strategy used by Orpheovirus, as previously suggested [6]. IF analyses at 1 h.p.i. demonstrated that more than one particle is able to penetrate the host cell (Fig. 3b). After entry, it was observed, by TEM, that the internal particle content is released into the cell cytoplasm through an ostiole located at the apex of the viral particles (Fig. 3c).

As previously described in other giant viruses, Orpheovirus morphogenesis occurs in subcellular microenvironments called VFs, which are located in the host cell's

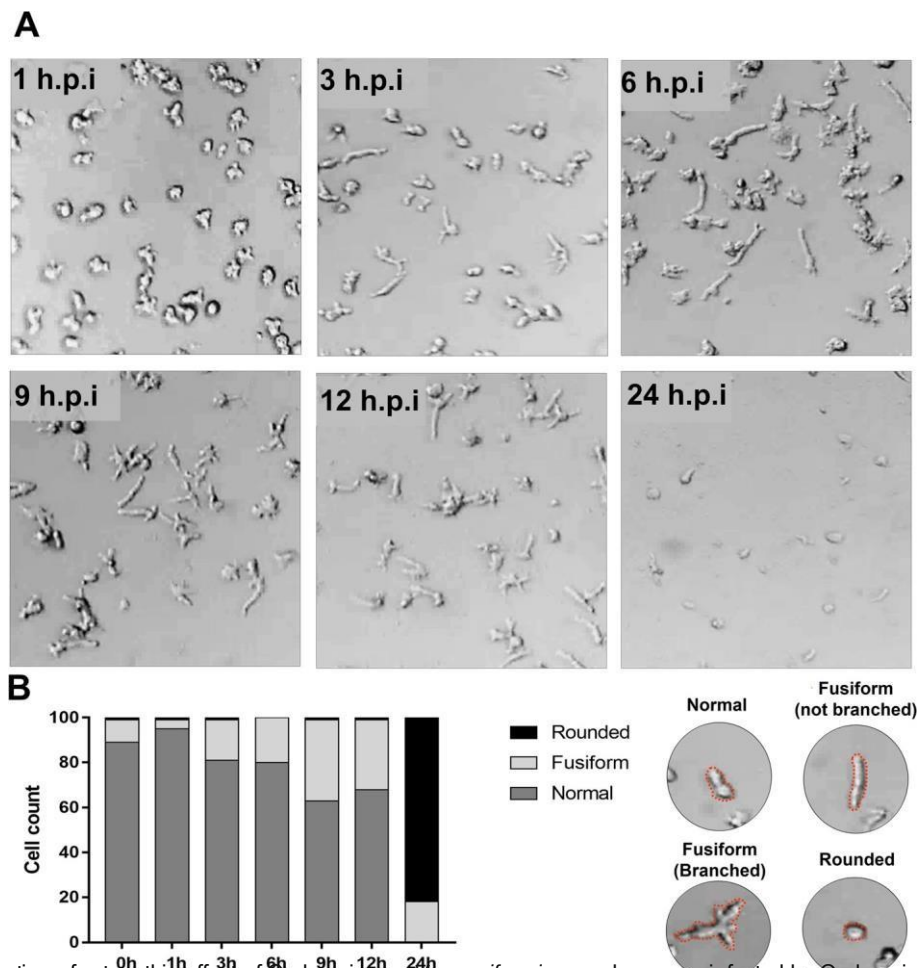


Fig. 1 Characterization of cytopathic effect of Orpheovirus. **a** *V. vermiformis* monolayer was infected by Orpheovirus using an M.O.I. of 10 and visualized by light microscopy. Cells became stretched with fusiform shapes at 3 h.p.i., and this effect became more evident at 9 h.p.i. and 12 h.p.i., respectively. At 12 h.p.i., fusiform branched cells were also observed. At 24 h.p.i., most cells observed were rounded; some fusiform cells were also visualized and cell lysis was more evident. **b** Counts of normal, fusiform (branched and not branched) and rounded cells. We observed a decrease of normal cells, while fusiform cells increased at 9 h.p.i., composing ~ 40% of the total infected cells. At 24 h.p.i., most cells were rounded, but some fusiform cells were also noticed (~ 20%)

cytoplasm. Similar to Cedratvirus and Pandoravirus VFs, Orpheovirus VFs are large electron-lucent areas, which occupy a large part of the host cell (Fig. 4a and b), and don't exhibit well-defined zones as observed for mimiviruses [11]. We also visualized, by TEM, the formation of VFs in perinuclear regions, and unlike those described for pandoraviruses, the host nucleus remains present during the infection (Fig. 4a-c) [3]. Interestingly, the formation of VFs with the presence of particles inside blebs in advanced steps of the viral replication cycle were evidenced by TEM images (Fig. 5a and b). Induction of bleb formation has also been described during Cedratvirus getuliensis infections in *A. castellanii* cells, but this event requires further investigation [12].

Mitochondrial recruitment was also observed in peripheral regions and inside VFs (Fig. 5c), as well as membrane

recruitment (Fig. 4a and b). The treatment of infected cells with BFA, a membrane trafficking inhibitor, at 8 h.p.i., affected both the formation of VFs and morphogenesis of new particles (Fig. 4c).

Morphogenesis dynamics of Orpheovirus particles

With analysis of TEM images of asynchronous infection of Orpheovirus (M.O.I. of 0.01), the formation of VFs that presented particles in different maturation stages was visualized (Fig. 6a), which obtained more information about the morphogenesis of new particles. The morphogenesis of Orpheovirus starts with the formation of electron-dense semicircular structures named crescents, as observed for other giant viruses, such as Faus-tovirus and Cedratvirus [9, 12]. These structures extend and are filled by the internal content until the formation

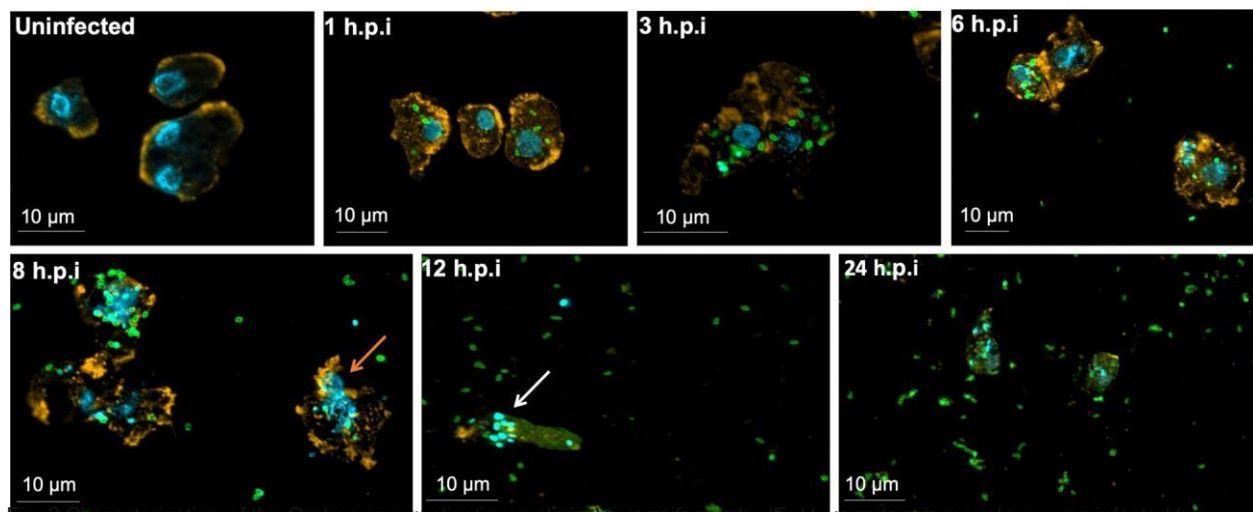


Fig. 2 Characterization of the Orpheovirus replication cycle in *V. vermiformis* by IF. *V. vermiformis* monolayer was infected by Orpheovirus at an M.O.I. of 5 and visualized by IF. At early time points, Orpheovirus particles are observed attaching to the surfaces of amoebae. At 3 h.p.i. and 6 h.p.i., respectively, an increase in particle amounts can be visualized within the host cells. At 12 h.p.i., we noticed viral particle polarization at one cell extremity and an increase of viral particles outside the cells. At 24 h.p.i., many cells were rounded, and the large majority of amoebae were already lysed. The viral particles are in green (anti-orpheovirus particle antibody), amoeba cytoskeleton in orange (stained by rodamine-phalloidine) and the nucleus in blue (stained by DAPI). Scale bar, 10 μm

of a mature particle (Fig. 6b-f). Recruitment of sheet-like structures in the periphery of the particles under assembly was also observed (Fig. 6e) and may be important for particle formation, which seems to be composed of several layers of proteins and membranes. Both by TEM and SEM images, it was evidenced that the mature particles have a flattening on one side (Fig. 6g and h).

In order to chronologically analyse viral genome replication and infectious particle formation, one-step growth assays were performed. An increase in genome amplification was observed at 9 h.p.i., and infectious particle detection increased at 12 h.p.i. (Fig. 6i-j). At 48 h.p.i., Orpheovirus propagation reached a plateau (Fig. 6i-j). The data corroborate those previously described [6],

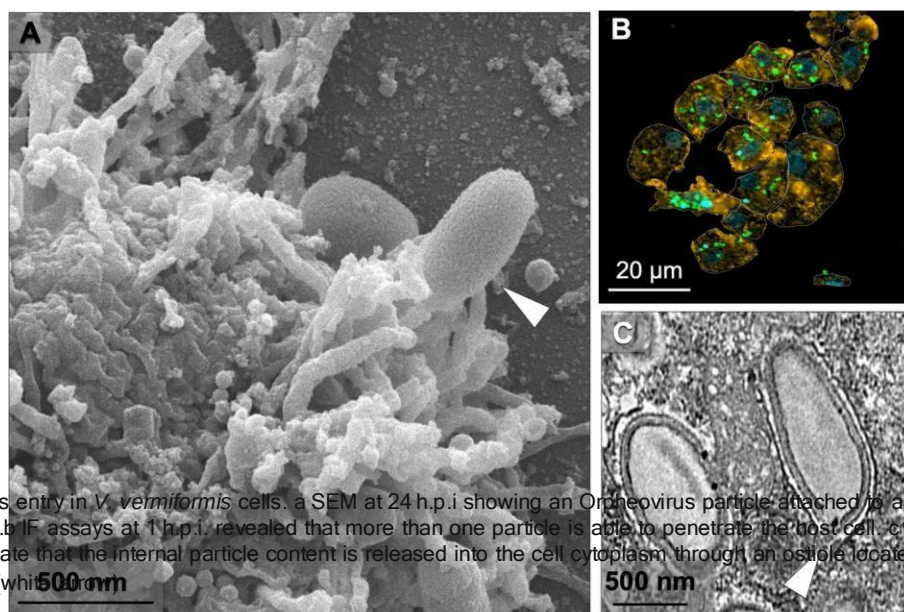


Fig. 3 Orpheovirus entry in *V. vermiformis* cells. a SEM at 24 h.p.i. showing an Orpheovirus particle attached to a *V. vermiformis* cell (white arrow). b IF assays at 1 h.p.i. revealed that more than one particle is able to penetrate the host cell. c TEM images at 24 h.p.i. demonstrate that the internal particle content is released into the cell cytoplasm through an ostiole located at the apex of the viral particle (white arrow). Scale bars: a 500 nm, b 20 μm, c 500 nm

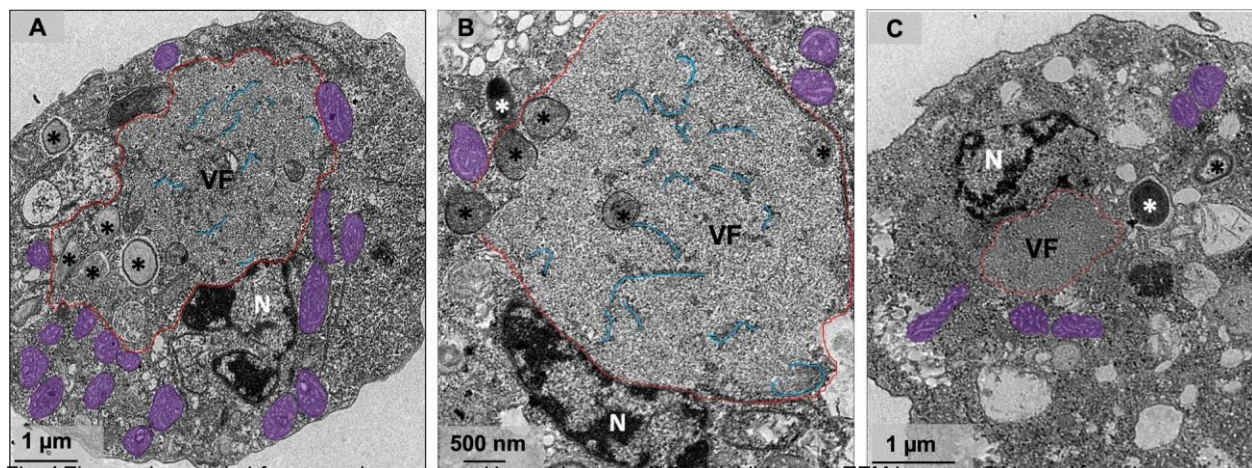


Fig. 4 Electron-lucent viral factory and treatment with membrane trafficking inhibitor. a-b TEM image at 24 h.p.i shows that Orpheovirus present an electron-lucent VF (contoured in red and in detail), which occupy a large part of the host and is observed in perinuclear regions. We also observed membrane recruitment inside the VF (blue), and the host nucleus remains present during the infection. c Treatment with BFA impacts both the formation of VFs and morphogenesis of new particles. VF: viral factory; N: nucleus; Mitochondria are highlighted in purple; *viral particles

which suggested that the cycle of Orpheovirus in *V. vermiformis* is slower compared to other giant viruses, during approximately 30 h.p.i.

In addition, it was observed that Orpheovirus particles have a smaller fibril layer compared to those observed in mimiviruses (Fig. 7a and b) [13]. The analyses also revealed that mature particles were present in an outer layer, a capsid layer and an inner membrane that involve the core of the particle (Fig. 7a and b). It is noteworthy that, even in infections with low M.O.I., the presence of defective particles in different formats was evidenced (Fig. 8a-c). This finding suggests that malformed

particles occur naturally, which is similar to other giant viruses [6, 10, 11].

Orpheovirus particles are released from the cell by lysis and exocytosis

After VF formation, expansion of the crescents, and complete maturation, new particles were visualized in peripheral regions in the host cell's cytoplasm (Fig. 9a), and some are involved with membranes. Furthermore, the presence of one or more particles in the same vacuole was observed, which may have more than one membrane (Fig. 9b-d). The presence of viral particles within

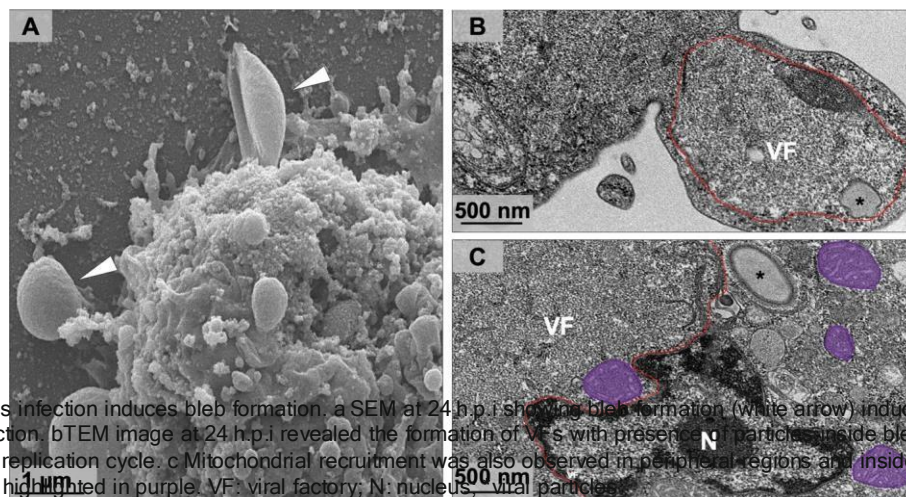


Fig. 5 Orpheovirus infection induces bleb formation. a SEM at 24 h.p.i showing bleb formation (white arrow) induced by Orpheovirus infection. b TEM image at 24 h.p.i revealed the formation of VFs with presence of particles inside blebs in advanced steps of the viral replication cycle. c Mitochondrial recruitment was also observed in peripheral regions and inside the VFs. Mitochondria are highlighted in purple. VF: viral factory; N: nucleus; *viral particles

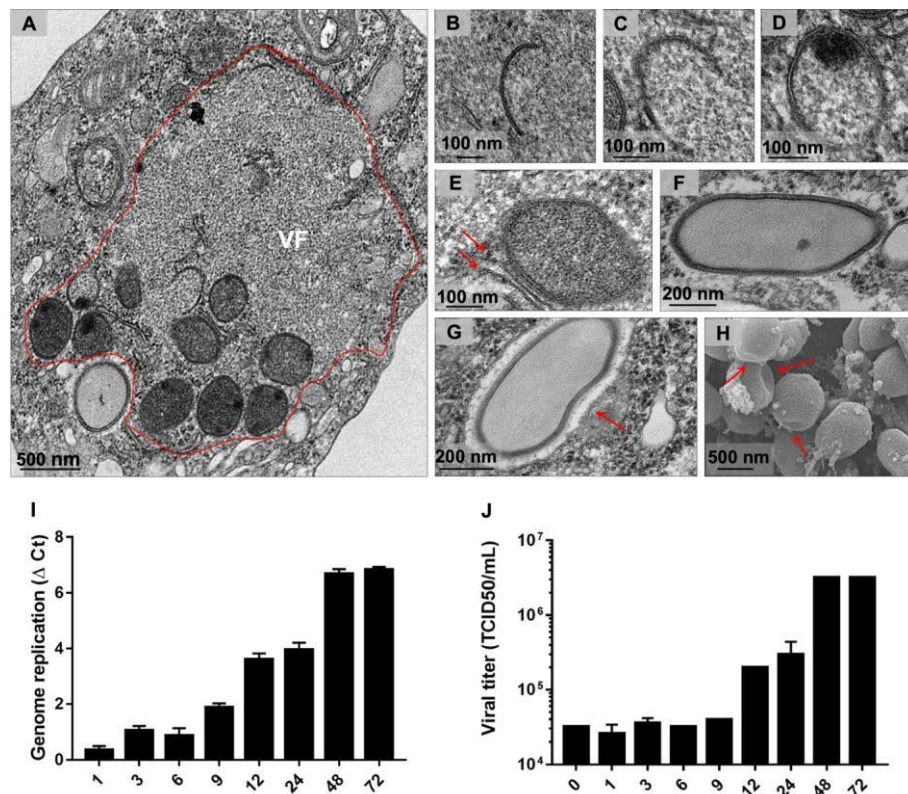


Fig. 6 Morphogenesis dynamics of Orpheovirus particles. a TEM images at 24 h.p.i. of asymptomatic infection of Orpheovirus evidencing the formation of VFs that presented particles in different maturation stages. b First discernible viral structures showing a crescent-shaped capsid precursor. c and d These structures extend and are filled by the internal content. e Recruitment of membranes in the periphery of the particles under assembly is also observed (red arrow). f Complete closure of the capsids and formation of mature particles. g and h Both by TEM and SEM images, it was evidenced that the mature particles have a flattening on one side (red arrow). i and j Orpheovirus one-step growth curve at an M.O.I. of 10

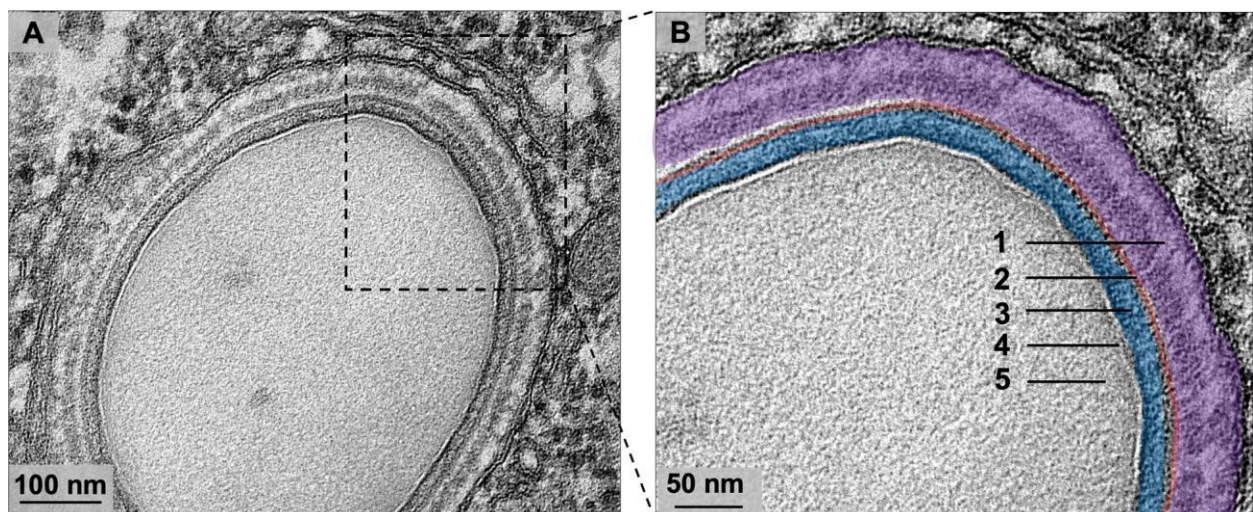


Fig. 7 Orpheovirus ultrastructure. a and b The analyses by TEM revealed that mature particles present a small fibril layer (1, purple), an outer layer (2, red), a capsid layer (3, blue) and an inner membrane (4, white) that involve the core of the particle (5, grey)

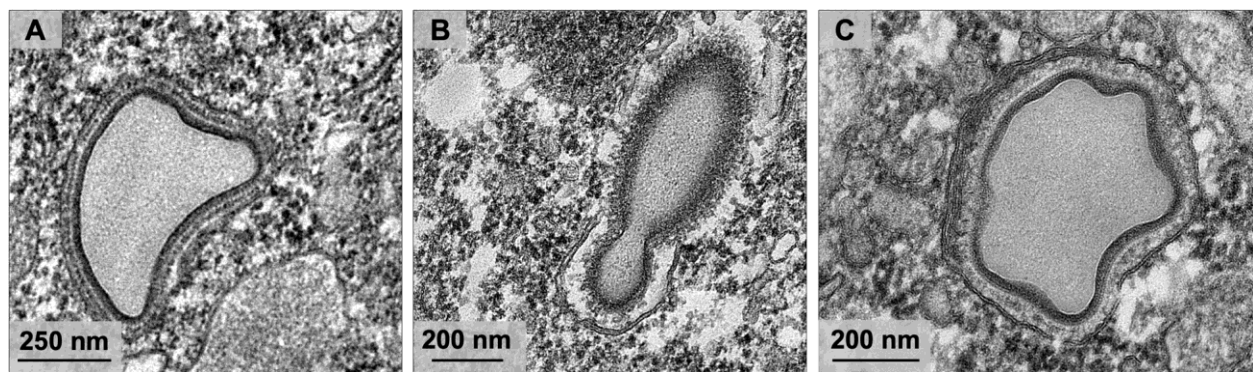


Fig. 8 Defective particles observed during Orpheovirus multiplication. a-c TEM analyses evidenced the presence of defective particles in different formats, even in infections with low M.O.I. and without the presence of virophage

vacuoles has also been reported for other giant viruses such as Pithovirus and Pandoravirus, suggesting that particles are released from host cells by exocytosis [3, 14, 15]. Biological assays, including cell and particle counts in the supernatant of infected amoebae were performed over the replication cycle (M.O.I. = 5). These analyses revealed that Orpheovirus particles can be detected in the supernatant of infected cells, even at times when no cell lysis is observed

(Fig. 9e and f). An increase in particle numbers was noted in the supernatant at 12 h.p.i. In addition, IF analyses performed at different times throughout the cycle also demonstrated an increase in the number of particles outside the cells at 12 h.p.i. and 24 h.p.i., respectively (Fig. 9e and Fig. 2), which reinforces exocytosis as an alternative strategy for host cell particle release (Fig. 10a), although cell lysis was also demonstrated by SEM images (Fig. 10b).

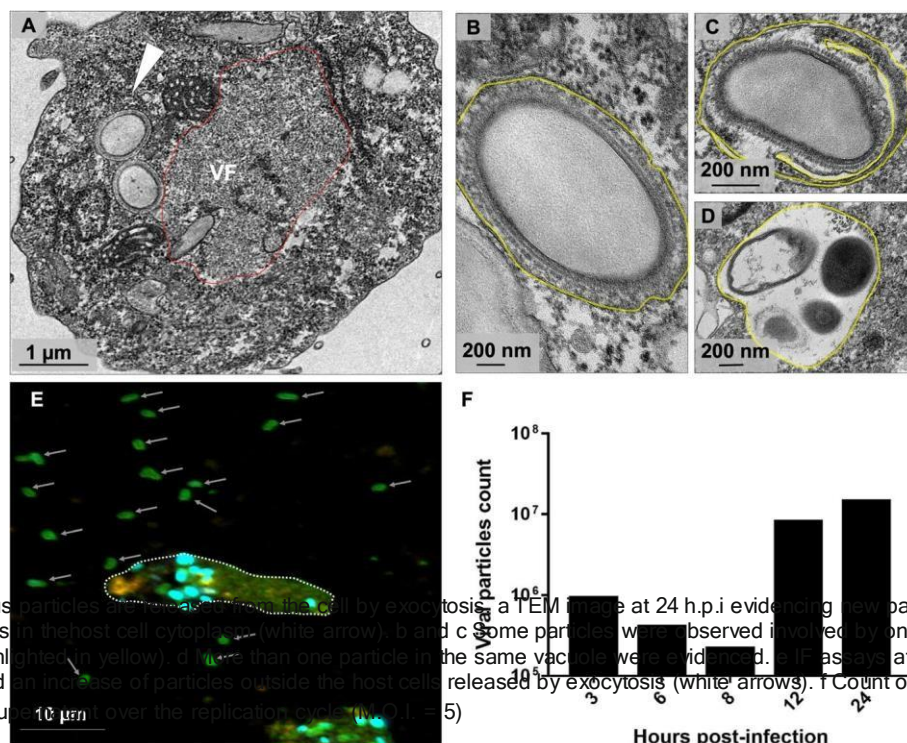


Fig. 9 Orpheovirus particles are released from a host cell by exocytosis. a TEM image at 24 h.p.i. evidencing new particles in peripheral regions in the host cell cytoplasm (white arrow). b and c Some particles were observed involved by one or more membranes (highlighted in yellow). d More than one particle in the same vacuole were evidenced. e IF assays at 12 h.p.i. showing fusiform cells and an increase of particles outside the host cells released by exocytosis (white arrows). f Count of Orpheovirus particles in the supernatant over the replication cycle (M.O.I. = 5)

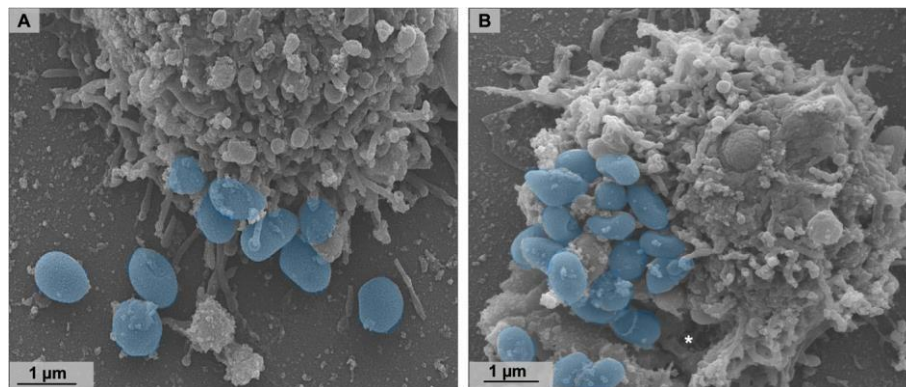


Fig. 10 Orpheovirus particles are released from the cell both by exocytosis and lysis. a SEM at 24 h.p.i showing particles released from the cell by exocytosis (highlighted in blue). b SEM at 24 h.p.i showing particles released from the cell by lysis (highlighted in blue). Asterisk shows damage on cell surface, where particles seem to be released

Discussion

Giant viruses have notable differences in their replication cycles and structures of their virions. After the discovery of this group of viruses, studies have been conducted to increase the knowledge of their biology and host interaction through investigations related to the life cycle of these organisms [11, 16, 17]. This study presents an in-depth description of the stages of the Orpheovirus life cycle, providing information about the entry, morphogenesis, release, structural characteristics and CPE triggered by this virus in its host cells. Other giant viruses are capable of inducing morphological changes in *V. vermiformis*, triggering amoebae aggregates called bunches, as described for Tupanvirus [10], and formation of plaque forming units evidenced for Faustovirus [9], as well as rounding and cell lysis. The morphological changes triggered by the Orpheovirus are different from those previously described, presenting cells with fusiform shapes and some branched cells. It is known that most giant viruses trigger cell rounding, which prevents the formation of pseudopods, and consequently decrease the motility of amoebae. Interestingly, in addition to morphological changes, we observed an increase in *V. vermiformis* cell motility never described before. Although speculative, one hypothesis is that this increased motility would be a strategy that would facilitate the infection of neighbouring cells, leading to an increased spread of viral particles.

The strategy of phagocytosis entry has often been described for other giant viruses, demonstrated through biological assays with pharmacological inhibitors for APMV and Cedratvirus getuliensis, which showed a considerable decrease in viral titres [11, 12]. Considering the fact that Orpheovirus particles are large (900–1100 nm), it was previously proposed that particle penetration would occur by phagocytosis [6]. After observing several SEM images, we noticed the formation of pseudopods in contact with Orpheovirus particles at the surface of host cells. Due to

this, we reinforce the hypothesis that phagocytosis would be exploited as an entry strategy, although other entry mechanisms should not be discarded. Once viruses enter cells, the internal particle content is released into the cell cytoplasm through an ostiole located in its apical region. This mechanism is also described for other giant viruses that have particles with similar morphology and are phylogenetically related to Orpheovirus [12, 14].

Unlike VFs described for mimiviruses, which present well-defined zones [11], VFs visualized during Orpheovirus infections are large electron-lucent areas located in perinuclear regions, where the morphogenesis of new particles occurs. Different than that previously observed for pandoraviruses, the nucleus remains during viral infection [3]. In addition, mitochondrial recruitment was observed in peripheral regions of VFs. Membrane recruitment was also observed inside VFs and is suggested to be important for the morphogenesis and vesicle formation phases for further particle exocytosis. Nevertheless, the origin of the recruited membranes needs to be investigated. Marseille-virus vesicles have recently been shown to consist of endoplasmic reticulum membranes, and after treatment with inhibitors, there was a decrease in formation of new particles and vesicles [17]. Also for Orpheovirus, we observe that the treatment with brefeldin impacts VF formation and morphogenesis. The morphogenesis of Orpheovirus particles occurs within the VFs, beginning with the formation of electron-dense semicircular structures called crescents. The formation of these structures is described for other giant amoeba viruses as well as other viruses belonging to the NCLDV group, such as Poxvirus [18]. These crescents become thicker, and throughout the cycle, they are filled with the inner particle content and become more electron-dense until completely closed.

Although Orpheovirus particles present an ovoid shape, similar to pandoraviruses, cedratviruses, and pithoviruses, they have a distinct structure. They have a

fibril layer that is smaller compared to other giant viruses, such as mimiviruses, that have fibrils, and despite scarce information about their constitution, they may be related to host cell adhesion, as demonstrated for mimiviruses [13]. Unlike Mimivirus, no specific area in which fibrils could be acquired was observed in VFs during Orpheovirus infection, and thus we hypothesized that they would be acquired within VFs [11].

Moreover, it was observed that, in addition to fibrils, the particles have an outer layer to the capsid layer and an inner membrane surrounding the core. The presence of one or more particles involved by membranes is described for Cedratvirus getiilensis and Pithovirus sibericum, suggesting that they would be released from the host cell by exocytosis [12, 14]. Although cell lysis has been demonstrated by SEM images and is described as the main strategy for viral progeny release, it is believed that exocytosis is an alternative mechanism used by Orpheovirus. A significant increase in particle counts of the supernatant was noted at 12 h.p.i., with no decrease in cell counts. In addition, by IF microscopy images throughout the cycle, we visualized an increase in the number of particles outside the cells at 12 h.p.i. and 24 h.p.i., respectively.

One-step growth assays showed an increase in viral titers at 12 h.p.i. and increased viral genome amplification by qPCR at 9 h.p.i., reaching a plateau at 48 h.p.i. by both qPCR analysis and titration. These data corroborate those previously proposed [6], which showed a replication cycle duration of approximately 30 h. Other giant viruses, such as Tupanvirus, Kaumobavirus and Faustovirus, capable of infecting *V. vermiformis* have also been shown to have a longer duration multiplication cycle [4, 5, 10] compared to giant viruses associated with amoebae of the genus *Acanthamoeba*. This suggests that the replication cycle duration profile of these viruses might be related to their host. Altogether, this work brings valuable information concerning the replication cycle, structure and CPE triggered by Orpheovirus, therefore contributing to enhance our understanding about this new giant virus. Future studies applying alternative methods will help to fill some gaps, especially concerning the virus-host interaction.

Conclusions

In summary, the data presented here reveal several peculiar characteristics of the life cycle, structure, CPE and host interaction contributing to improve our understanding about this new giant virus.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1268-8>.

Additional file 1: Video S1 Orpheovirus infection induces an increase in the motility of *V. vermiformis* cells, especially those

Abbreviations

APMV: *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus; BFA: Brefeldin A; CPE: Cytopathic effect; h.p.i: hours post infection; IF: Immunofluorescence; M.O.I: Multiplicity of infection; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; SEN: Scanning electron microscopy; TEM: Transmission electron microscopy; VFs: Viral factories

Acknowledgments

We thank our colleagues from Gepvig and the Laboratório de Vírus for their excellent technical support and the Center of Microscopy of UFMG.

Authors' contributions

FS, RR, ER, ML performed experiments; JA designed the study; FS, RR, BL, JA wrote the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

We thank CNPq, CAPES, and FAPEMIG for scholarships and financial support. J.S.A. is a CNPq researcher.

Availability of data and materials

All relevant information is provided in this current manuscript. If required, the data presented in this work can be shared by e-mail.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil. ²Microbes, Evolution, Phylogeny and Infection (MEPHI), Aix-Marseille Université UM63, Institut de Recherche pour le Développement IRD 198, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France. ³Institut Hospitalo-Universitaire (IHU)-Méditerranée Infection, Marseille, France.

Received: 26 September 2019 Accepted: 9 December 2019
Published online: 16 December 2019

References

1. La Scola B, Audic S, Robert C, Jung J, De Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D. A giant virus in amoebae. *Science*. 2003; 299(5615):2033.
2. Pagnier I, Reteno DG, 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*. 2013; 56(6):354–63.
3. ACDS PA, Victor de Miranda Boratto P, RAL R, Bastos TM,

This effect starts at 6 h.p.i. and became more evident at 12 h.p.i.. This movie is not accelerated.

- Azevedo BL, Dornas FP, Oliveira DB, Drumond BP, Kroon EG, Abrahão JS. New isolates of Pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. *J Virol*. 2018;93(5):e01942–18.
4. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, Andreani J, Armstrong N, Klose T, Rossmann M, Colson P, Raoult D, La Scola B. Faustovirus, an Asfarvirus-related new lineage of Giant viruses infecting amoebae. *J Virol*. 2015;89(13):6585–94.
5. Bajrai LH, Benamar S, Azhar EI, Robert C, Levasseur A, Raoult D, La Scola B. Kaumobavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses*. 2016;8(11):278.
6. Andreani J, Khalil JYB, Baptiste E, Hasni I, Michelle C, Raoult D, Levasseur A, La Scola B. Orpheovirus IHUMI-LCC2: a new virus among the giant viruses. *Front Microbiol*. 2018;8:1–11.

7. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938;27(3):493-7.
8. Abrahão JS, Oliveira GP, Ferreira Da Silva LC, Dos Santos Silva LK, Kroon EG, La Scola B. Mimiviruses: Replication, purification, and quantification. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;41(1):14G-1.
9. Borges I, Rodrigues RAL, Dornas FP, Almeida G, Aquino I, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS. Trapping the Enemy: *Vermamoeba vermiformis* Circumvents Faustovirus Mariensis Dissemination by Enclosing Viral Progeny inside Cysts. *J Virol.* 2019;JVI:003012-9.
10. Silva LCF, Rodrigues RAL, Oliveira GP, Dornas FP, La SB, Kroon EG, Abrahão JS. Microscopic analysis of the tupanvirus cycle in *vermamoeba vermiformis*. *Front Microbiol.* 2019;10:671.
11. ACDSP A, RAL R, Oliveira GP, Andrade KR, Bonjardim CA, La Scola B, Kroon EG, Abrahão JS. Filling knowledge gaps for Mimivirus entry, Uncoating, and morphogenesis. *J Virol.* 2017;91(22):e01335-17.
12. Silva LKDS, Andrade ACDSP, Dornas FP, Rodrigues RAL, Arantes T, Kroon EG, Bonjardim CA, Abrahão JS. Cedratvirus getuliensis replication cycle: an in- depth morphological analysis. *Sci Rep.* 2018;8:1-11.
13. Rodrigues RAL, dos Santos Silva LK, Dornas FP, de Oliveira DB, Magalhães TFF, Santos DA, Costa AO, de Macêdo FL, Magalhães PP, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Cortines JR, Abrahão JS. Mimivirus fibrils are important for viral attachment to the microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. *J Virol.* 2015;89:11812-9.
14. 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 JM. Thirty- thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:4274-9.
15. Legendre M, Fabre E, Poirot O, Jeudy S, Lartigue A, Alempic JM, Beucher L, Philippe N, Bertaux L, Christo-Foroux E, Labadie K, Couté Y, Abergel C, Claverie JM. Diversity and evolution of the emerging Pandoraviridae family. *Nat Commun.* 2018;9(1):2285.
16. Mutsafi Y, Shimon E, Shimon A, Minsky A. Membrane assembly during the infection cycle of the Giant Mimivirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003367.
17. Arantes TS, Rodrigues RAL, dos Santos Silva LK, Oliveira GP, de Souza HL, Khalil JYB, de Oliveira DB, Torres AA, da Silva LL, Colson P, Kroon EG, da Fonseca FG, Bonjardim CA, La Scola B, Abrahão JS. The large Marseille virus explores different entry pathways by forming Giant infectious vesicles. *J Virol.* 2016;90(11):5246-55.
18. Maruri-Avidal L, Domi A, Weisberg AS, Moss B. Participation of Vaccinia virus L2 protein in the formation of crescent membranes and immature Virions. *J Virol.* 2011;85:2504-11.

Publishers Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Review

Comparative analysis of Transcriptional Regulation Patterns: Understanding the Gene Expression Profile in *Nucleocyto- virocota*

Fernanda Gil de Souza[‡]; Jônatas Santos Abrahão^{*}; Rodrigo Araújo Lima Rodrigues^{‡*}

Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

[‡]These authors contributed equally to this work

^{*} Correspondence: Correspondence: jonatas.abrahao@gmail.com / rodriguesral07@gmail.com

Abstract: The nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV) possess unique characteristics that have drawn the attention of the scientific community, and they are now classified in the phylum *Nucleocyto-
virocota*. They are characterized by sharing many genes and have their own transcrip-
tional apparatus, which provides certain independence from their host's machinery. Thus, the
presence of a robust transcriptional apparatus has raised much discussion about the evolutionary
aspects of these viruses and their genomes. Understanding the transcriptional process in NCLDV
would provide information regarding their evolutionary history and a better comprehension of the
biology of these viruses and their interaction with hosts. In this work, we reviewed NCLDV tran-
scription and performed a comparative functional analysis of the groups of genes expressed at
different times of infection of representatives of six different viral families of giant viruses. With this
analysis, it was possible to observe a temporal profile of their gene expression and set of genes
activated in specific phases throughout the multiplication cycle as a common characteristic of this
group. Due to the lack of information regarding the transcriptional regulation process of this group
of pathogens, we sought to provide information that contributes to and opens up the field for

transcriptional studies of other viruses belonging to *Nucleocyto-
virocota*.

Keywords: NCLDV; transcription; giant viruses; gene expression; evolution

Citation: Souza, F.G.; Abrahão, J. Rodrigues, R.A.L. Comparative analysis of Transcriptional Regulation Patterns: Understanding the Gene Expression Profile in *Nucleocyto-
virocota*. *Pathogens* **2021**, *10*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV) are characterized by sharing a set of conserved genes related to replication, transcription and morphogenesis, a phenomenon that suggests these viruses have a common evolutionary origin. Subsequent analyses of sequenced genomes of isolated viruses belonging to new families have supported the monophyly of the NCLDV group [1]. Initial comparative genomic analyses have derived a set of 40 core genes common to NCLDV. Among these core genes, there are only a few conserved in all viruses belonging to this group known to date, including DNA polymerase B family, helicase-primase, and the late transcription factor 3 [2–4]. This set of genes called ‘hallmark genes’, reconstructed as present in the common ancestor, seem to have origins from different sources, the majority being homologous to

eukaryotic genes and a small part derived from bacteriophage genes [3].

Distinct viral families are part of the NCLDV group, including *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Ascoviridae*, *Mimiviridae* and *Marseilleviridae*. NCLDV have recently been officially classified into a new phylum, namely *Nucleocyto-
virocota* [5]. Other recently discovered giant viruses such as pandoravirus, faustovirus, kaumoeba-
virus, cedratvirus, pithovirus, mollivirus, pacmanvirus, orpheovirus and medusavirus have also
been included as members of the NCLDV group, despite not being officially

classified into any existent taxa [6–14]. This group has unique characteristics such as large particles and genomes, which encode proteins that have never been described in other viruses [15]. Another characteristic shared by NCLDV is the fact that they replicate entirely or partially in the host cell's cytoplasm, in which some viral groups exhibiting little dependence on the host cell's transcriptional machinery, such as poxviruses and mimiviruses [15,16]. The presence of a robust transcriptional apparatus in some NCLDV has raised discussion about the origin and evolution of these viruses and their genomes [16]. In addition, their gene transcription is temporally regulated, allowing sets of genes to be classified as early, intermediate or late in accordance with the stage of infection when they are transcribed. A previous study has divided the genes of NCLDV into clusters of orthologous groups (NCVOG), many of which could be assigned to putative functional classes [1].

In this work, we reviewed NCLDV transcription and performed a comparative functional analysis according to what had been described previously for NCVOG as early, intermediate and late genes expressed throughout the replication cycle of different viruses, considering representatives of six viral groups within *Nucleocytoviricota*. This analysis provides information on a transcriptional pattern of these viruses, with additional evidence for a common origin of this group of pathogens. Furthermore, understanding the regulation of gene expression throughout the replication cycle also improves our knowledge about the biology of giant viruses.

2. Temporal Regulation of Gene Expression

Transcriptional regulation involves a sequence of steps and although most of them have been studied extensively using static biochemistry, much about the real-time kinetics of transcription has not been completely elucidated [17]. As previously described, NCLDV have many characteristics in common. Among these characteristics, the transcription of their genes has a temporal profile, being classified as early, intermediate and late; the genes expressed at each time point have different functions. The expression of each class of gene occurs in a cascade. This is due to the fact that the required transcription factors for the expression of each class of genes are the product of the genes previously expressed [18]. In that way, the products of some genes expressed early during the replication cycle of the virus will be required as transcription factors to induce the expression of other genes that will be expressed during the intermediate and later course of infection. Despite having a similar transcriptional regulation profile, the expression of the genes of each temporal class occurs at different times among NCLDV, due to the fact that their replication cycles last for different length of times. Nevertheless, the expression of genes from different time classes occurs at similar phases throughout the NCLDV multiplication cycle, that is, early, intermediate and late during the course of the infection [16,18].

Such temporal classification has been possible due to the development of new techniques to quantify the expression levels of a large number of genes [19]. DNA microarrays were one of the first tools that allowed the large-scale study of the transcriptome. The technique is based on the hybridisation of target strands on the complementary probe strand, allowing the identification of genes that are expressed at different times during the viral infection. A major limitation of this technique is to evaluate genes with low expression. Nevertheless, the advance of large-scale sequencing tools has allowed a more robust evaluation of the transcriptome of viruses. RNA sequencing (RNA-seq) has been widely used to study the gene expression profile of organisms and viruses, allowing a more in-depth comprehension of their transcriptional pattern. This technique provides complete sequencing of all expressed genes during the replication cycle of a virus, even if the genes have a low level of expression (depending on the coverage of the sequencing), allowing a better characterisation of the virus's transcriptome. A full description of the fundamentals and possible usage of these techniques are beyond the scope of this review, but this topic has been extensively addressed elsewhere [20,21]. Although

these tools are based on different technologies, both techniques make it possible to quantify the levels of gene expression and have had similar coverage in studies that have compared both techniques. Hence, they can be used in comparison or as complementary methods in studies involving gene expression [19]. These techniques have been used to study the expression profile of different large and giant viruses, as will become apparent in the subsequent sections, providing important information about the biology of these viruses.

3. Transcription in Nucleocytoviricota

3.1. Poxvirus Gene Transcription

Among the viral families that comprise NCLDV, *Poxviridae* is by far the most studied group. Viruses belonging to this family have enveloped, ovoid-shaped particles that are 200 nm in diameter and 300 nm in length. Its genome consists of linear double-stranded DNA (dsDNA) of approximately 200 kilobase pairs (kbp), encoding 200 open reading frames (ORFs) (Table 1) [22,23]. This viral family comprises many human and other animal pathogens, including the one responsible for the most devastating disease that has affected humankind, the variola virus.

Viruses possess a great diversity in genome composition, structure, replication and transcriptional strategies, which is manifested both in their biology and the host–virus interaction. Some DNA viruses with smaller genomes depend on host cell enzymes for transcription, including RNA polymerase [16]. However, some DNA viruses with larger genomes can encode their transcriptional apparatus, making them relatively independent of the host's transcriptional machinery [24]. The complexity of the poxvirus genome instigated speculation that these viruses synthesize their genome independently of the host nucleus. The transcription of poxvirus genes follows a temporal profile and is regulated by promoter regions and transcriptional factors. Thus, the genes are classified into early, intermediate and late, and they are activated in a cascade sequence [16,18,25].

Table 1. General information and transcriptional classification of *Nucleocytoviricota* representative members of different families.

Family	Virus	Particle size (nm)	Genome size (Kbp)	Proteins encoded	Temporal classification	Time range	Host range of the family	Ref
<i>Poxviridae</i>	VACV	200-300	195	218	E, I, L	E (0.5-1h); I (1-2h); L (4h)	Mammals, birds, reptile, fish, insects	[22, 23, 29]
<i>Asfarviridae</i>	ASFV	200	170	152	IE, E, I, L	NA	Pigs and wild boars	[35, 36]
<i>Iridoviridae</i>	FV-3	300	105	91	E, I, L	E (2h); I (4h); L (9h)	Reptile, fish, insects, crustaceans	[37, 38]
<i>Ascoviridae</i>	HVaV-3g	300-400	199	194	E, L, VL	NA	Arthropods	[45-47]
<i>Phycodnaviridae</i>	PBCV	100-220	350	376	E, L	E (5-10 min); L (60-90 min)	Eukaryotic algae	[50-53]
<i>Mimiviridae</i>	APMV	750	1,180	979	E, I, L	E (0-3h) I (3-6h) L (>6h)	Acathamoeba sp	[57, 59, 61]
<i>Marseilleviridae</i>	MRSV	200-250	368	457	E, I, L	E (0-1h) I (1-2h) L (>4h)	Acathamoeba sp	[63, 64]
<i>Pandoraviridae</i> *	PANDV	1,000	2,470	1,430	NA	NA	Acathamoeba sp	[6]
<i>Pithoviridae</i> *	PITHV	1,500	610	467	NA	NA	Acathamoeba sp	[11]
<i>Molliviridae</i> *	MOLLV	600	651	523	NA	NA	Acathamoeba sp	[10]

NA: data not available; IE: Immediately early; E: Early; I: Intermediate; L: Late; VL: Very late. *Taxa proposal. Classification not officially recognized by ICTV. VACV: Vaccinia virus; ASFV: African swine fever virus; FV-3: Frog virus 3; HVaV-3g: Heliothis virescens ascovirus 3g; PBCV: Paramecium bursaria chlorella virus NSy1; APMV: Acanthamoeba polyphaga mimivirus; MRSV: Marseillevirus T19; PAND: Pandoravirus salinus; PITHV: Pithovirus sibericum; MOLLV: Mollivirus sibericum.

Early transcribed genes encode proteins necessary for DNA replication, transcription of intermediate genes and evasion of host defences, while intermediate and late genes encode structural proteins that participate in the morphogenesis of viral progeny [18]. In addition, genes transcribed later encode components of the early transcriptional apparatus, present in the mature particle. After entry and release of the genetic content in the host cell cytoplasm, early transcription factors bind to AT-rich promoter sequences in upstream and downstream regions of the transcription start site, leaving the early genes available for viral RNA polymerase [18,26]. Subsequently, RNA polymerase is recruited, forming a complex with early transcription factors (VETF), termination factors and poly(A) polymerases, which bind to RNA polymerase through the RAP94 domain [27]. The RAP94 domain, which is specific to the RNA polymerase packaged in the virion, is the key link between the RNA polymerase and VETF, being essential for gene expression [28]. It is interesting to note that there are no homologs of RAP94 outside poxviruses, suggesting the poxvirus early gene transcription system as an evolutionary outlier [18].

Transcription of intermediate and late genes occurs immediately after DNA synthesis is initiated. Vaccinia virus intermediate and late transcription requires RNA polymerase synthesized after infection. Differently for early genes, the presence of RAP94 is not essential for these classes of genes [29]. Some viral proteins like VITF-1, a subunit of RNA polymerase, as well as a viral capping enzyme and a heterodimer of VITF-3, have been identified as necessary for the transcription of intermediate genes [18,27,28]. Besides the viral proteins, a cellular component called VITF-2 was found to be necessary to complement *in vitro* viral transcription [30,31]. The presence of intermediate promoter motifs regulates the expression of late transcription factor genes, consistent with the cascade model of regulation. For late gene transcription, the viral proteins encoded by *A1L*, *A2L*, *G8R*, and *H5R* genes have been identified as essential. These proteins have been described as showing activity as late transcription factors [32]. As observed for poxviruses' early transcription factors, none of the intermediate or late transcription factors have significant homologs in cellular proteins, highlighting the uniqueness of the viral regulatory system. As observed for intermediate genes, cellular components are suggested to participate in the regulation of late genes. Finally, *in vitro* assays suggest a role for a host factor originally called VLTF-X, and also the association of the TATA-box binding protein (TBP) for viral intermediate and late transcription [29,33]. The virus-encoded transcription factors may link the TBP to the viral RNA polymerase and place the initiator in the correct position near the active site for their respective promoters, thus regulating the gene expression [18].

Analyses performed with cells infected with cowpox virus (CPXV), monkeypox virus (MPXV), vaccinia virus (VACV) have demonstrated that approximately 96% of the cellular transcripts did not change the expression profile. Of the cellular genes that changed the expression profile, 64.3%, 68.2% and 70% had an increase in the expression profile modulated by infection by CPXV, MPXV and VACV, respectively. Besides, a typical pattern of transcriptional modulation among the three viruses has been identified. Thus, of the 321 host cell transcripts modulated by MPXV infection, 241 (75.1%) are also modulated by CPXV and 148 (46.1%) by VACV [34]. This temporal profile of gene transcription seems to be a common characteristic not only among members of the family, but also of other viruses related phylogenetically to poxviruses, such as asfarviruses that infect mammals.

3.2. Asfarvirus Gene Transcription

The African swine fever virus (ASFV) is the only characterized member of the *Asfarviridae* family. This pathogen can infect pigs and wild boars. Its genome consists of linear dsDNA, with approximately 170–194 kbp capable of encoding 150–170 predicted proteins [35]. They present enveloped icosahedral particles that are approximately 200 nm in diameter (Table 1) [36]. Like poxviruses, their replication cycle occurs in the host cell's cytoplasm and presents some independence in the transcription process. It is also capable of encoding RNA polymerase, poly(A) polymerase and mRNA capping enzyme. Its transcriptional machinery resembles that of its host. Therefore, it also possesses RNA polymerase containing eight subunits, RNA ligase, capping enzyme, mRNA decapping enzyme, initial transcription factors, elongation factors, histone-like proteins and topoisomerase [36].

Similarly to viruses belonging to the family *Poxviridae*, its transcription also presents a temporal profile. Genes classified as immediate early and early are expressed before the beginning of DNA replication. Then, intermediate and late genes are expressed. This control of gene expression is regulated by promoter motifs and transcription factors [16,36]. Researchers recently mapped transcription initiation sites; they identified them in 'upstream' regions of 151 genes present in the ASFV genome [35].

Transcriptomic analysis of genes to classify them temporally, based on RNA-seq and CAGE-seq, identified 101 genes that show differences in their expression in early and late times of infection. Only two time points were evaluated, at 5 and 16 hours post-infection (hpi); therefore, the genes were just classified as early or late, according to the evaluated moment of infection. Based on both techniques, 36 genes were classified as early – related to transcription, evasion of the host's immune response and DNA replication – and 55 as late – related to transcription, viral structure, morphogenesis and DNA replication [35]. New transcriptomic analysis of ASFV, considering the entire time range of infection, would bring valuable information about the temporal classification of all genes, establishing a landscape for the transcriptome of this important swine pathogen.

3.3. Iridovirus Gene Transcription

The family *Iridoviridae* is divided into two subfamilies. The subfamily *Alphairidovirinae* comprises the genera *Ranavirus*, *Megalocyttivirus* and *Lymphocystivirus*, which are pathogenic to ectothermic vertebrates. The subfamily *Betairidovirinae* is composed of the genera *Iridovirus*, *Chloriridovirus* and *Decapodiridovirus*, which are pathogens of invertebrates such as insects and crustaceans [37]. Their genomes consist of linear dsDNA that is approximately 105–212 kbp and encodes 92–211 predicted proteins. In addition, they have non-enveloped, icosahedral particles that are 300 nm in diameter (Table 1) [38,39].

Like other members of the phylum *Nucleocytoviricota*, their replication occurs partially in the host cell's cytoplasm. Even with homologous RNA polymerase subunits in the iridoviruses genome, host cell RNA polymerase is necessary to synthesize early gene transcripts of viruses belonging to the *Ranavirus* and *Iridovirus* genera [16,40]. Thus, early mRNAs are synthesized in the nucleus using the host cell's RNA polymerase II in the early stages. However, it is believed that the late transcripts are synthesized in the cytoplasm of the host cell by the RNA polymerase encoded by the virus [41]. Its gene expression is temporally regulated and results in the expression of three classes of genes: immediate early, early and late [38,41]. Analyses performed with members of the genus *Iridovirus*, such as red sea bream iridovirus (RSIV), identified nine immediate early genes, 40 early genes and 38 late genes [42].

The same temporal profile of gene expression regulation has been described for other members of the family *Iridoviridae* and the genus *Ranavirus*, including frog virus 3 (FV-3). This gene has 33 immediate early genes, 22 early genes and 36 late genes [41]. Although the number of genes belonging to the different time classes are not the same, the temporal profile of gene expression regulation is similar among the members of the family *Iridoviridae*. Immediate early genes are expressed shortly after infection of the host cell and can produce transcripts even in the presence of protein synthesis inhibitors.

Among the products of their transcripts, some factors will activate the transcription of early genes. Early genes encode proteins associated with DNA replication, whereas late genes are expressed after viral DNA replication begins and encode the components of the viral particle [42,43].

3.4. Ascovirus Gene Transcription

The family *Ascoviridae* consists of two genera. The *Ascovirus* genus includes the species *Heliothis virescens ascovirus 3a* (HvAV-3a), *Spodoptera frugiperda ascovirus 1a* (SfAV-1a) and *Trichoplusia ni ascovirus 2a* (TnAV-2a). The *Toursvirus* genus comprises *Diadromus pulchellus ascovirus 4a* (DpAV-4a) as its only representative species. Viruses belonging to this genus can infect arthropods, mainly lepidopterans, in their larval stage, causing a fatal disease. They have enveloped particles that are 300–400 nm in length and 100–150 in diameter [44,45]. Its genome is circular dsDNA with approximately 116–185 kbp that encode 117–180 predicted proteins (Table 1) [44].

The gene that encodes the major capsid protein has been used to analyse the relationship among the species of the *Ascoviridae* family and other viral families such as *Iridoviridae*. Ascoviruses are believed to have evolved from iridoviruses, based on phylogenetic analyses using the major capsid protein gene and the fact that they share homologous protein sequences. Thus, transcriptional regulation may have been maintained during the evolutionary process [16,46]. Studies on ascoviruses are scarce, especially regarding the processes that regulate the transcription of their genes. Currently, the knowledge we have about ascovirus transcription comes from studies mainly related to the *Ascovirus* genus [47].

Analyses performed using the SfAV-1a virus as a model established temporal transcription classes for the identified genes. Its replication cycle lasts approximately 48 hours; thus, 17 genes were classified as early, being expressed 6 hpi. They have functions related to nucleotide metabolism, inhibition of apoptosis, interaction with the host and, surprisingly, five of these early genes possess functions related to the viral structure. All the early genes analysed continue to be expressed even at later time points during the infection. Of all the analysed genes, 44 had their transcription initiated 12 hpi, being classified as late. These genes present functions related to RNA and DNA metabolism and viral structure, including the major capsid protein and lipid metabolism. In addition, 11 genes expressed 24 hpi were classified as very late; they are related to viral structure, lipid metabolism, transcription factors and some with no known function [47].

3.5. Phycodnavirus Gene Transcription

The *Phycodnaviridae* family currently consists of the genera *Chlorovirus*, *Coccolithovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus* and *Raphidovirus*; the members infect a diverse group of eukaryotic algae. These viruses are the primary pathogens of these algae, found mainly in marine environments, responsible for a significant control of the host cell population in the oceans. The genome can be linear or circular dsDNA of approximately 180–560 kbp, depending on the specific group of viruses, capable of encoding over 300 predicted proteins, as well as 11 genes that encode tRNAs [48,49]. It presents icosahedral particles that vary between 100 and 220 nm in diameter (Table 1). As described for other viruses belonging to the phylum *Nucleocytoviricota*, phycodnaviruses also have a temporal transcriptional profile.

The most studied phycodnaviruses are those belonging to *Chlorovirus* genus, commonly named chloroviruses. Their replication cycle lasts approximately 6–8 hours, and the transcription of its genes can be divided into early and late stages. The transcription of early genes starts 5–10 minutes after the onset of infection, and the transcription of the late genes begins 60–90 minutes after the start of DNA synthesis [50–52]. Analyses of the transcriptional profile using *Paramecium bursaria chlorella virus 1* (PBCV-1) as a model identified that 62% of the 365 predicted proteins were expressed at early times. Of the 227

genes expressed before the beginning of viral DNA synthesis, 127 were classified as early and 100 as early/late, which were also detected after viral DNA synthesis. In addition, 133 transcripts were classified as late due to the fact that they were expressed only after the beginning of viral DNA synthesis [51]. Although the transcription of early genes involves transcription factors incorporated into the mature particle, none of the early coded genes that were analyzed were identified as being expressed late and incorporated into the particle. Therefore, these viruses generally depend on the host algae to provide most transcription functions, at least for immediate early expression [51,52].

Unlike other NCLDV members, phycodnaviruses do not encode their own RNA polymerase: they depend on the host cell's RNA polymerase for the transcription of their genes. Thus, viral DNA and associated proteins migrate to the nucleus to start transcription [53]. However, it has been reported that *Emiliana huxleyi* virus 86 (EhV-86) has six RNA polymerase subunits, suggesting that this particular member of the *Phycodnaviridae* family encodes its transcriptional apparatus and might have had a different evolutionary history compared with other relatives [54]. Transcriptomic data on *Emiliana huxleyi* virus 201 (EhV-201) showed that all six RNA polymerase subunits are expressed at distinct levels, but all at an early or early-late stage of the virus life cycle, possibly being key regulators of the transcription of late genes [55].

Despite having essential elements for transcription, most *Phycodnaviridae* family members do not have their own transcriptional apparatus. The diversity within *Phycodnaviridae* is vast and, despite being a monophyletic group, it appears that each group within the family had a distinct evolutionary pathway, probably related to the hosts to which they are associated. Such differences may point to a reorganization of the family at the taxonomic level in the future [56]. However, the regulation of transcription in this family as well as other NCLDV presents a temporal profile that has been conserved during the evolutionary process.

3.6. Transcription of Mimiviruses and Other Giant Amoeba Viruses

In 2003, the discovery of the first giant amoeba virus, *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV), led to the establishment of the *Mimiviridae* family, also belonging to the NCLDV group [57]. Viruses belonging to this family have characteristics never before described in the virosphere, such as particles ~700 nm in diameter, capable of being visualized by optical microscopy. In addition, they have in their particles a layer of fibrils (~120 nm in length) suggested to be immersed in a matrix of peptidoglycan [58]. They also have a face named star-gate, related to the release of the genome in the host cell's cytoplasm [59]. Its genome is composed of a dsDNA molecule of approximately 1.2 mega base pairs (Mbp), capable of encoding more than 1000 predicted proteins, and a wide range of elements related to transcription (Table 1) [60].

Like other NCLDV, mimiviruses also have a temporal transcription profile in which the transcribed genes are classified as early, intermediate and late [61]. Genes classified as early are expressed from 0 to 3 hpi. This class of genes is functionally diverse, but most of them are composed of genes with functions not yet determined. Three aminoacyl-tRNA synthetases – TyrRS (L124), MetRS (R639) and ArgRS (R663) – belong to this temporal class and researchers suggest they are involved in viral protein translation from the beginning of the multiplication cycle. In addition, enzymes involved in DNA repair are also expressed during the early stages of the multiplication cycle [61,62], whereas genes classified as intermediate are expressed between 3 and 6 hpi; most of these genes encode proteins involved in the DNA replication stage, such as DNA polymerase and late gene transcription factors.

Finally, genes classified as late are expressed 6 hpi. These genes encode the structural elements such as the major capsid protein and enzymes present in the particles that are necessary at the beginning of the infection. Some topoisomerases, important in DNA replication and encapsidation, are also part of the late gene class. Products related to the expression of late genes have been detected through proteomics analyses in more signif-

icant proportions than those of other temporal classes [60–62]. Due to the interest of the scientific community in this group of viruses, many other giant viruses have been isolated over the years, identifying a large part of the pathogens of amoebae that had never been investigated. For example, in 2009 researchers isolated a new giant virus in a culture of *A. polyphaga* named *Marseillevirus marseillevirus* (MRSV) from water samples collected in cooling towers in Paris, France. Due to the fact that they present distinct characteristics of mimiviruses, possessing an icosahedral symmetry capsid approximately 250 nm in diameter and a completely new genome, the new viral family *Marseilleviridae* was created (Table 1) [63].

Like mimiviruses, Marseilleviruses also have a temporal transcription profile. Analyses have demonstrated that of the 457 genes identified from Marseilleviruses, 83 (18%) are classified as early (0–1 hpi), 218 (48%) as intermediate (1–2 hpi) and 156 (36%) as late (4 hpi). Of all the analysed genes, 316 have no known function, 36 are related to DNA replication and repair and 25 are related to signal transduction regulation. In addition, genes related to nucleotide metabolism (8 genes), transcription (13 genes), translation (4 genes), and viral structure and morphogenesis (10 genes) have been identified [64].

After the discovery of the first giant viruses and the increasing interest of the scientific community in this group, a great diversity of other giant viruses have been isolated, including faustovirus, pandoravirus, pithovirus, and mollivirus, among others. These giant viruses possess particles ranging from 200 to 1500 nm in diameter and a genome from 466 kbp to 2.5 Mbp encoding 450–2500 predicted proteins (Table 1) [6,7,10,11]. These viruses have a set of identified transcriptional elements, including subunits of RNA polymerase, which suggests that these viruses have greater autonomy in this process. Interestingly, medusavirus, a recently isolated and characterized amoeba virus, has no homologue of RNA polymerase and seems to have a greater dependence on the host for gene transcription [14]. However, this virus has other components of the transcriptional apparatus, including transcription factors SII and VLTF3, which are expressed during the virus life cycle [65]. Regarding other relatives, the gene expression of medusavirus is also temporally regulated, with most of the genes related to DNA replication being expressed at early and intermediate times, while genes involved in virion morphogenesis are expressed at intermediate and late moments of the virus replication cycle [65]. Studies aiming to elucidate how gene expression is regulated in most amoeba viruses are still needed. Despite having similar temporal regulation profiles that can indicate a common origin, studies providing information about the functions of genes belonging to different temporal classes and whether this profile is also maintained among the different viral families belonging to NCLDV are required.

4. Functional comparative analysis of temporally expressed genes from pathogens of *Nucleocytoviricota*

It is clear that different members of *Nucleocytoviricota* have a similar pattern of gene expression. However, some questions deserve closer attention. Are the functions observed in genes expressed in different temporal classes similar among different NCLDV? Which functions are shared and predominant in different temporal classes of genes? To answer those questions and to obtain a general picture of this scenario, we performed a functional comparative analysis of the transcription profile and the genes expressed by different NCLDV using the BLASTp and InterProScan tools. We only included viruses whose transcriptome data related to the full extension of the replication cycle and covering all genes were available to allow a proper comparison of the data: MRSV (GenBank accession number NC_013756.1), APMV (GenBank accession number NC_014649.1), VACV (GenBank accession number AY243312.1), FV3 (GenBank accession number AY548484.1), EhV-201 (GenBank accession number JF974311.1) and medusavirus (GenBank accession number AP018495.1). We obtained all the CDSs whose transcriptomic data were available and performed a re-annotation considering the best hit of BLASTp against non-redundant (*nr*) protein database with an e-value cutoff of 1×10^{-5} , and

searching for conserved domains by using default parameters of InterProScan. After gene re-annotation, we classified them into functional groups compared with the NCVOG categories [1]. To obtain a clear picture and to allow a proper comparison among the viruses, we classified the genes into the following temporal classes: early, intermediate and late, considering the previous classification [25,41,55,61,64,65]. Here it is important to note that the replication cycle of each virus has a different time range. Considering this particular point, we classified the genes into three distinct temporal classes – early, intermediate and late – based on the moment when they are expressed according to transcriptome data instead of the exact time (hours) of expression to avoid misinterpretation of the data. It is also important to note that in the original works, the authors may have defined different temporal classes for the virus (e.g. *Emiliana huxleyi* virus and medusavirus), where genes expressed very early in the replication cycle were identified and defined as "immediate-early" genes. Nevertheless, these are genes expressed in the initial (early) phase of the virus replication cycle. Thus, for a proper comparison, we decided to group the genes considered "immediate-early" and "early" into a single category, named "early" genes. A similar rationale was used for the reclassification of genes of other viruses into the three temporal patterns adopted in this study. For viruses that had only three temporal patterns defined, the patterns were maintained considering the three phases of the replicative cycle. This strategy allowed us a proper comparison among viruses whose subdivision in genes expressed in different phases of the replication cycle was not originally defined. For a comparison between the original classification and that adopted in this study, see Table S1.

Marseillevirus T19 has 83 coding sequences (CDS) classified as early genes (18%), 218 (48%) as intermediate, and 156 (34%) as late (Figure 1A). The main functions observed for early genes of Marseillevirus are related to DNA replication and recombination, transcription and signal transduction and some metabolic functions. Of the 83 genes classified as early, 3 (3.6%) are related to DNA replication and recombination. Most genes related to DNA replication are expressed at intermediate or late times during infection; however, some can be expressed as soon as the particle is internalized by the host cell. In addition, 7 (8.4%) genes are related to the transcription process, such as those encoding helicase and RNA polymerase subunits, 13 (15.6%) with regulation and signal transduction like some kinases and only 1 (1%) is related to nucleotide metabolism (Figure 2, Table S2). The transcription of early genes related to signal regulation and transduction, which encode serine/threonine kinase, suggests that the virus has the potential to manipulate its host's responses, facilitating the establishment of productive infections. Regarding genes classified as intermediate, the main functions observed are also related to DNA replication and recombination in (25/218, 11.5%), followed by signal transduction regulation (8/218, 3.7%). Interestingly, many genes involved in DNA metabolism are also expressed during late stages of the replication cycle, suggesting a continuous process of DNA manipulation during the virus life cycle. All of genes related to virion structure and morphogenesis are expressed late, an expected feature considering that these genes are involved in the formation of new viral particles (Figure 2, Table S2).

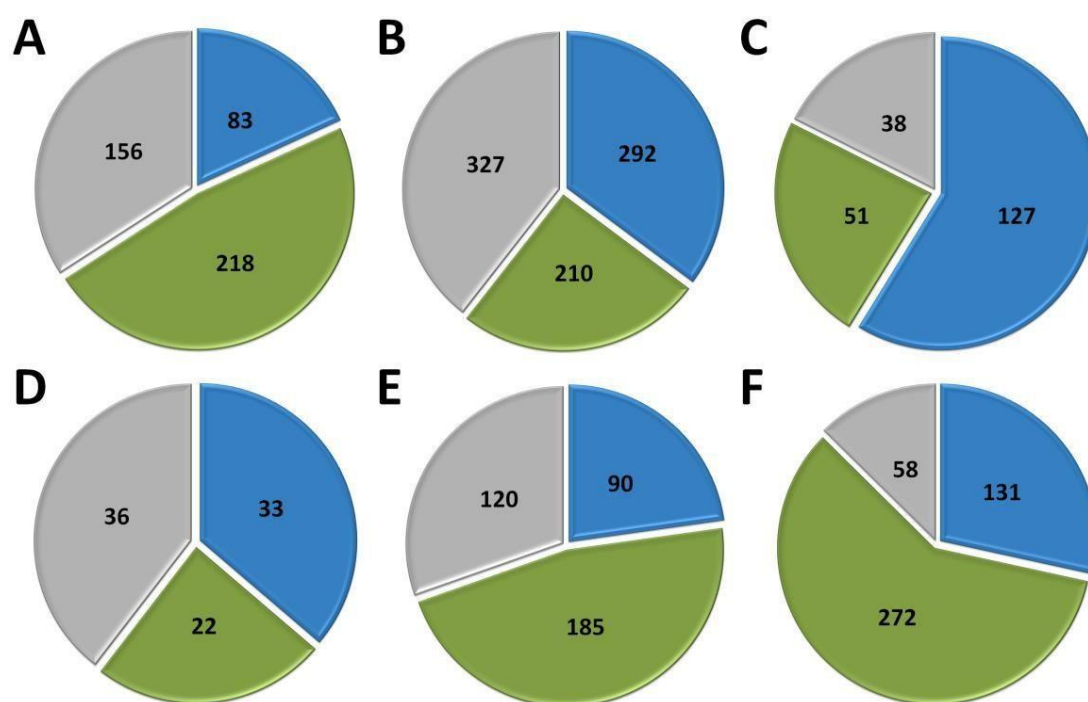


Figure 1: Temporal expression profile of viral genes. Genes for each virus were classified according to the phase of the replicative cycle they are expressed, named early (blue), intermediate (green), and late (grey). The numbers of genes associated to each temporal class are indicated. A) Marseillevirus (*Marseilleviridae*); B) Mimivirus (*Mimiviridae*). C) Vaccinia virus (*Poxviridae*). D) Frog virus 3 (*Iridoviridae*). E) Emiliana huxleyi virus 201 (*Phycodnaviridae*). F) Medusavirus (*Medusaviridae*).

APMV has a total of 979 CDS, but for this analysis we included only genes for which transcriptome data were available, for a total of 829 genes [53]. The remaining 150 genes remain to be classified as soon as new data are obtained. It is important to note that after APMV genome re-annotation [62], some genes initially predicted as complete coding sequences are now considered a single CDS. In that sense, a few differences in the number of genes originally classified into distinct temporal classes and the one adopted in this study occurred (Table S1). Approximately a third of APMV genes (292, 35.2%) are expressed early, 210 (25.3%) are intermediate and 327 (39.5%) are expressed in the final moments of the virus life cycle (Figure 1B). Most of the genes related to DNA replication, recombination and repair are classified as intermediate genes, but there are others expressed at other moments in the replication cycle, including DNA primase and some helicases (Figure 2, Table S3). Genes involved in transcription and RNA processing, including transcription factors, are expressed early, while RNA polymerase subunits are predominantly expressed at intermediate and late times, possibly being important for further viral transcript synthesis. APMV encodes at least 31 genes involved in signal transduction regulation, including F-box domain-containing proteins and serine/threonine kinases, which are evenly distributed among distinct temporal classes of expression. A distinct feature of the APMV is the presence of translation-related genes, including aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) [52]. A total of 8 CDS are members of the translational apparatus of APMV, with 4 being early expressed, including 3 aaRS, 1 intermediate (the remaining aaRS fall into this category, i.e. cysteinyl-tRNA synthetase), and 3 late genes (Figure 2). Similar to MRSV, most of genes involved in the mimivirion structure are classified as late genes (14/18, 77.7%) (Figure 2, Table S3). It is interesting to

note that most of these genes are putative membrane genes, possibly involved in the formation of a virus factory and for establishing the initial steps of virion morphogenesis. The gene coding for the major capsid protein (L425) is a late gene.

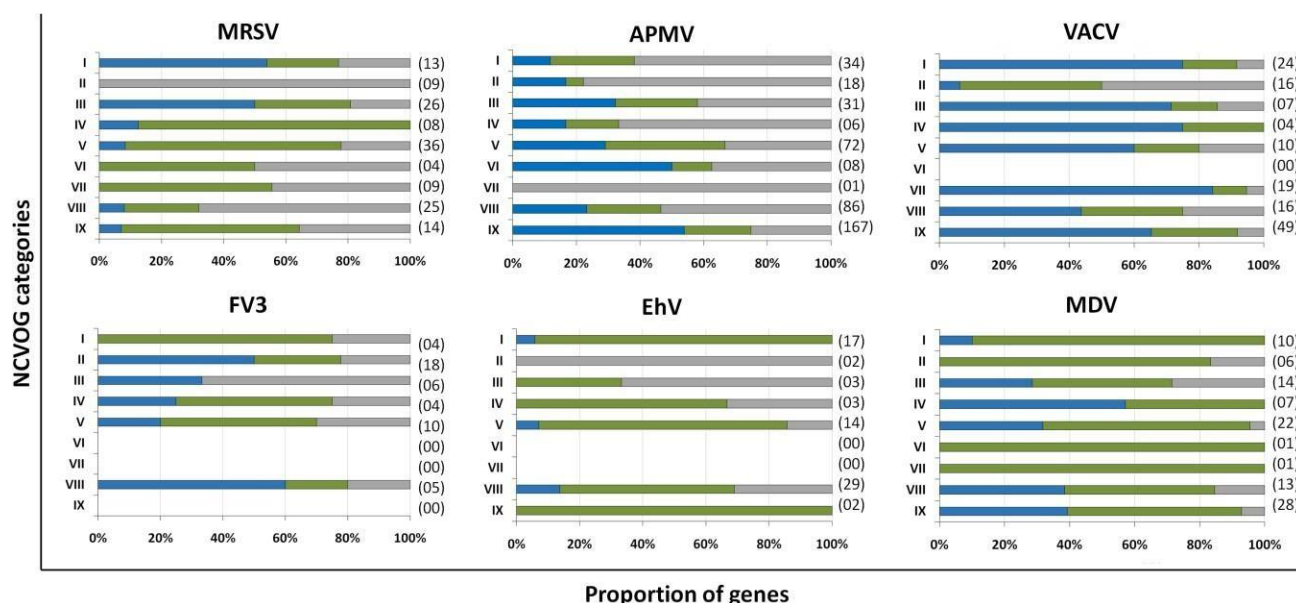


Figure 2. Distribution of genes from different functional categories into temporal gene expression classes. The x-axis contains the different functional categories based on the NCVOG classification. The y-axis represents the proportion of genes for each functional category for all six viruses included in the analysis. Data are shown as a percentage to allow for proper comparison. The number of genes associated with each category are indicated in parenthesis. I, transcription and RNA processing; II, virion structure and morphogenesis; III, signal transduction; IV, nucleotide metabolism; V, DNA replication, recombination and repair; VI, translation; VII, host–virus interaction; VIII, other metabolic functions; IX, miscellaneous. APMV, mimivirus; MRSV, Marburg virus; VACV, vaccinia virus; FV3, frog virus 3; EhV, Emiliania huxley virus 201; MDV, medusavirus. The complete data are included in tables S2–S7.

Differently from MRSV and APMV, VACV infects mammals and has been one of the most studied viruses throughout history. Among the 218 genes, 118 (54.1%) are expressed at the initial moments of the replication cycle, while 51 (23.4%) and 38 (17.4%) are intermediate and late genes, respectively (Figure 1C). A few VACV genes are duplicated in the terminal regions of the genome and we included these genes in the analysis as early genes (Table S1), considering that the corresponding genes were originally classified in this temporal class [25]. It is interesting to note that VACV has many known genes related to the host–virus interaction, most of which (16/19, 84.2%) are expressed during the early moments of the virus life cycle (Figure 2). Among these genes are those related to the host immune response interaction, such as soluble interferon- α/β receptor and chemokine-binding proteins. Most of the genes involved in the transcription and RNA processing of VACV are expressed early (18/24), while only 4 and 2 genes are expressed at intermediate and late phases of the replicative cycle, respectively (Figure 2, Table S4). Genes involved in DNA replication, recombination and repair are mostly expressed at the early and intermediate phases, and most genes related to virion morphogenesis are classified as intermediate and late genes (Figure 2, Table S4). Although the functions of many VACV genes have been predicted, almost 40% of the genome remains uncharacterized and many genes have yet to be functionally evaluated, including several genes that have been annotated as ankyrin repeat domain-containing proteins that is similar to other NCLDV.

Among NCLDV included in this analysis, FV3 has the smallest genome and, consequently, fewer genes. Of the 91 genes analyzed, 33 (36.3%) are classified as early, 22

(24.2%) as intermediate and 36 (39.5%) as late (Figure 1D). Half of the FV3 genes have no known function. Ten genes are involved in DNA replication, recombination and repair, with 5 being classified as intermediate, 2 as early and 3 as late (Figure 2, Table S5). Only 4 genes are involved with transcription and RNA processing, including 2 RNA polymerase subunits and transcription elongation factor SII, all classified as intermediate genes, and the VLTF3, expressed in the late phase of the replicative cycle. We did not observe genes involved in translation or the host–virus interaction (Figure 2). It is important to note that the absence of genes involved in direct interaction with the host as well as the fact that only a few are involved in signal transduction regulation (2 early genes, 4 late genes) do not indicate that FV-3 only weakly manipulates the host cell. On the contrary, these data should be interpreted with caution given the large number of genes that have not been characterized, and genes involved in the manipulation of host metabolism could be identified with further studies. Curiously, most of the genes involved in virion structure, annotated as surface proteins, are classified as early genes (9/18, 50%), while only 4 (22.2%) are classified as late (Figure 2, Table S5). This is in sharp contrast to other NCLDV, where genes involved in the virion structure and morphogenesis are mostly classified as intermediate or late genes. Nevertheless, the gene encoding the conserved major capsid protein is late expressed, as observed for most other NCLDV (Figure 3A).

EhV-201 encodes 447 genes and single cell RNA-seq data indicate that all genes are expressed throughout the replication cycle evaluated from 0 to 24 hpi [50]. These genes are expressed at different moments, which we defined as early, intermediate and late. However, due to the limited data, 52 genes (11.6%) could not be assigned to a category in the original study. Therefore, for our analysis we considered only the genes that had been confidently classified into distinct temporal classes. From these 395 genes, 90 (22.8%) are expressed early, 185 (46.8%) are intermediate and 120 (30.4%) are late (Figure 1E). The large majority of EhV-201 genes have no known function (374/447, 83.7%). Among the 73 genes with defined functions, 3 could not be included in any temporal class. Genes related to DNA replication, recombination and repair are mainly expressed at intermediate moments of the replication cycle, similarly to other NCLDV, while those related to the virion structure and morphogenesis are expressed late (Figure 2, Table S6). Most genes of the transcriptional apparatus of EhV-201, including all 6 RNA polymerase subunits, are considered intermediate genes, with only one transcription factor, VLTF2, being expressed early (Figure 2, Table S6). Curiously, genes whose products are involved in lipid and protein metabolism – for example, lipases and proteases – are most expressed early, suggesting a putative role affecting the host's metabolism.

Researchers recently evaluated the transcriptional landscape of medusavirus by using RNA-seq; this virus was isolated from hot spring water in Japan and contains 461 protein-coding genes [14]. Of these genes, 131 (28.4%) are considered early, being expressed between 0 and 2 hpi; 272 (59%) are intermediate, expressed between 2 and 4 hpi; and 58 (12.6%) are late, expressed after 4 hpi, with higher expression after 8 hpi [65] (Figure 1F). Similarly to other NCLDV, the majority of medusavirus genes are uncharacterized (359/361, 77.9%). Most genes related to DNA metabolism are expressed until 4 hpi, including DNA polymerase and viral homologues for histone proteins (Figure 2, Table S7). Despite the lack of RNA polymerase, medusavirus contains some genes involved in the transcription process, such as transcription factors that are classified as intermediate genes. Interestingly, the viral poly-A polymerase is early expressed and might be related to the poly-adenylation of viral transcripts during the replication cycle. Genes involved in signal transduction are evenly distributed in the three temporal classes, suggesting a constant interaction with the metabolic pathways of the host (Figure 2). Finally, it is curious that, differently from other NCLDV, most of the genes associated with the medusavirus structure and morphogenesis are classified as intermediate genes, with only a putative membrane protein being expressed late (Figure 2). This profile differs from those observed in other NCLDV and a deeper investigation regarding the morphogenesis of this virus could bring important novelties for the field.

As mentioned before, we reclassified the viral genes into three different temporal patterns of expression, considering the different phases of a viral cycle, that is the beginning (early), middle (intermediate), and ending (late), so we could make a proper comparison among the six distinct viruses. However, more than three expression patterns can exist, as originally evidenced for some viruses [55,65]. These additional patterns are probably related to specific regulatory elements, including promoter motifs and transcription factors. It is worth noting that other viruses outside NCLDV, including herpesviruses, baculoviruses, and bacteriophages, also have similar patterns of gene expression [66–68]. Usually, these expression patterns are defined by clustering methods, considering similar profiles of expression levels of the genes, which can indicate the existence of different temporal divisions, despite being expressed in the same phase of the replicative cycle. It results in the definition of different categories by distinct authors. We do not intend to establish a general concept here, but it is important to mention that for a proper comparison, we must consider the different phases of the replicative cycle instead of the different expression patterns defined by clustering methods.

The six viruses included in this comparative analysis exhibit differences in many aspects, including viral structure, genome, and host range. Nevertheless, many studies have been evidencing their common origin [69–72]. The most recent hypothesis indicates that *Nucleocytoviricota* members evolved from a small group of viruses (*Tectiviridae*), most likely following an accordion-like model of genomic evolution [71,73]. Despite the differences, a common feature among these viruses is the temporal regulatory pattern for gene expression, as revised in this study. Our analysis indicates that despite differences in the genetic arsenal, genes involved in the same biological process are generally expressed in the same phase of the replicative cycle of a virus. A striking divergence is the genes related to other metabolic functions, which are expressed in different phases depending on the virus. It could be due to the direct relationship with the host, where the virus would manipulate the host metabolism, which is specific for each group of eukaryotic organisms. These viral genes were possibly obtained by horizontal gene transfer (HGT) from the host throughout evolution, thus not following a similar expression pattern. Interestingly, for the most conserved genes (i.e., the six genes observed in 95% of all NCLDVs [4]), the expression pattern is similar for all the six viruses, despite some differences can be observed mainly for the vaccinia virus' genes, which are majorly early expressed (Figure 3A). That may remain true for other NCLDVs and even their distant tectiviruses relatives. A transcription cascade model of gene expression has been evidenced for tectiviruses [74], reinforcing the hypothesis that the common ancestor of these viruses and NCLDVs already had that mechanism of gene regulation.

Altogether, our findings highlight a common feature among members of *Nucleocytoviricota*: a temporal pattern of gene expression. In general, most of the genes with predicted functions fall into the early (323 genes) and intermediate (325 genes) class of temporal expression, independently of their functional classification (Figure 3B). An expected exception is the genes related to the virion structure and morphogenesis, most of which are classified as late genes. Genes belonging to different functional classification are unevenly distributed among the viruses included in this analysis; we can expect that such a result remains true when other NCLDV are considered (Figure 3C, Figure S1). Despite a common pattern for temporal gene expression, a feature possibly inherited from the last common ancestor of *Nucleocytoviricota*, it is most likely that each viral group has had a different history of gene gain and loss [75], possibly due to interaction with distinct hosts and sympatric organisms, resulting in different proportions of functional categories of orthologous genes. It is not completely clear whether the transcriptional regulatory patterns observed for NCLDVs are different from other viruses. Different dsDNA viruses, including both large and small representatives (e.g. herpesvirus and bacteriophages), have been described as having a transcription cascade model of gene expression [66,68,76]. Here we only compared the transcriptional patterns of viruses related to six different taxa, all belonging to the phylum *Nucleocytoviricota*. In this sense, it is

not possible to claim any exclusivity for the NCLDVs concerning the patterns of gene regulation. Instead, we might expect that such a model of transcription regulation was broadly selected throughout the evolution for different groups of dsDNA viruses, being a striking example of convergent evolution. A more in-depth comparison of the underlying regulatory mechanisms of gene expression among distinct groups of dsDNA viruses could bring valuable insights into their evolution.

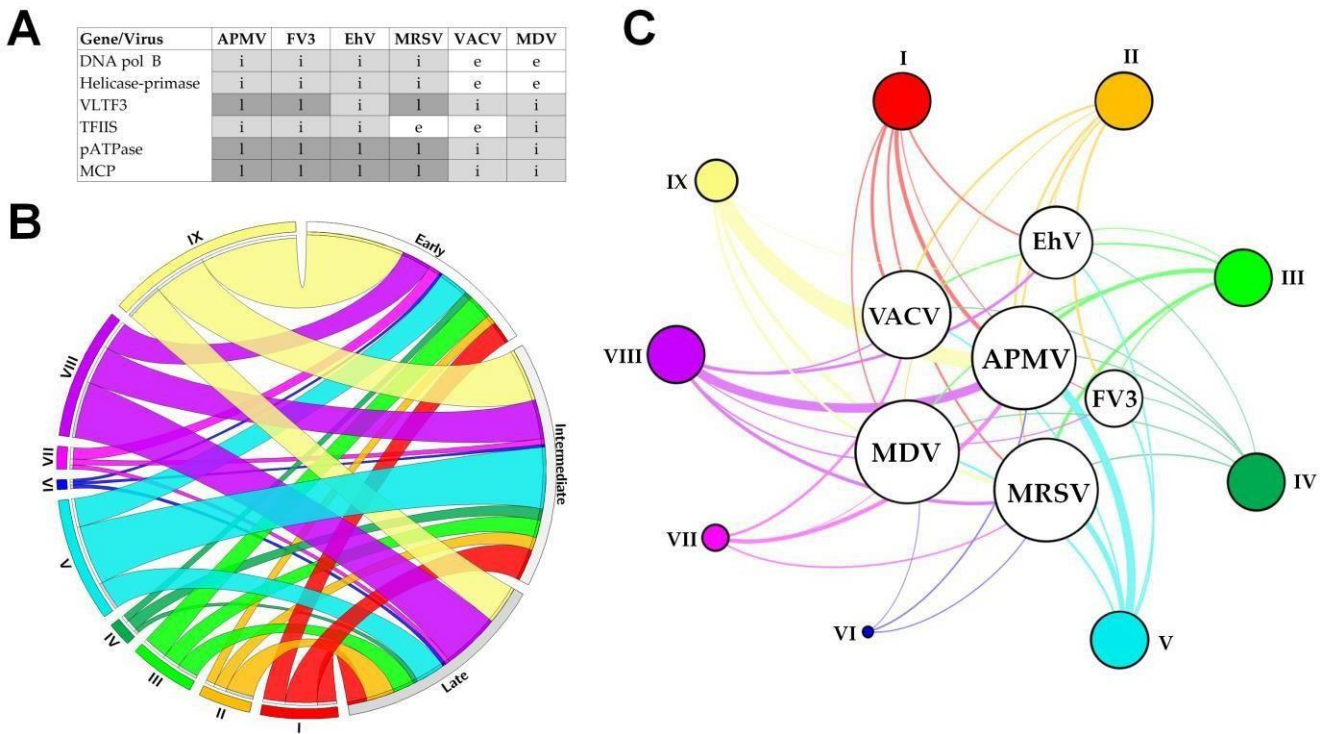


Figure 3. Distribution of functional categories of genes among distinct time of expression and nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV). A) Temporal expression pattern of the six most conserved genes among NCLDVs. B) A Circos plot representing the proportion of different functional classes of genes and their respective moment of expression considering the viruses’ life cycle (early, intermediate and late). C) A bipartite network graph connecting different viruses by distinct functional categories of genes. The node diameters are proportional to the edge degree. The edge thicknesses are proportional to the number of genes belonging to each functional class identified in the genome of each virus. The net-work graph was built using Gephi version 0.9.2. The layout was generated using a force-based algorithm followed by manual rearrangement for better visualisation of the connections. Abbreviations: e: early; i: intermediate; l: late; (I–IX) Functional classes of genes: I, transcription and RNA processing; II, virion structure and morphogenesis; III, signal transduction; IV, nucleotide metabolism; V, DNA replication, recombination and repair; VI, translation; VII, host–virus interaction; VIII, other metabolic functions; IX, miscellaneous. APMV, mimivirus; MRSV, Marseillevirus; VACV, vaccinia virus; FV3, frog virus 3; EhV, Emiliania huxleyi virus 201; MDV, medusavirus.

5. Conclusions and perspectives

Many concepts about the virosphere have changed with studies carried out over the years following the discovery of NCLDV. This group shares many genes related to the replication of the genome and the formation of the viral structure, called ‘viral hallmark genes’, which point to the monophyly of this group. In addition, many members of this group have a nearly complete transcriptional apparatus, which provides some independence from their hosts’ machinery. Thus, the presence of a robust transcriptional

apparatus has raised much discussion about the evolutionary aspects of these viruses and their genome.

In this work, we performed a comparative analysis of groups of genes expressed at different times of infection of different members of the NCLDV group. We observed that a common characteristic of this group is a temporal expression profile of their genes throughout the replication cycle, a characteristic which has been maintained throughout the evolution. Overall, genes related to genome transcription and replication are generally expressed in the initial/middle phase of the replicative cycle, while those associated with virion morphogenesis and structure are mainly expressed in the final phase of the virus life cycle. Understanding how the genes of a given pathogen are expressed provides data that assist researchers in understanding their biology and interaction with their hosts. In addition, information regarding the regulation of the expression of these genes can also assist in studies with the objective of interrupting this process at a certain point in the cycle to contribute to the resolution of possible diseases caused by different viral pathogens. Finally, this study compiles information about the regulation of gene expression of different pathogens that opens up the field for transcription studies of other NCLDV, for which this process has not been completely elucidated. The analysis presented here provides insights into the gene expression profiles of other viral pathogens belonging to *Nucleocytoviricota* and can be used as a starting point for future transcriptomic investigations.

Supplementary Materials: Table S1. Comparison of original data and this study on temporal classification of genes. Table S2. Marseillevirus T19 (*Marseilleviridae*) functional/temporal gene classification. Table S3. Acanthamoeba polyphaga mimivirus (*Mimiviridae*) functional/temporal gene classification. Table S4. Vaccinia virus (*Poxviridae*) functional/temporal gene classification. Table S5. Frog 3 virus (*Iridoviridae*) functional/temporal gene classification. Table S6: Emiliana huxleyi 201 (*Phycodnaviridae*) functional/temporal gene classification. Table S7: Acanthamoeba castellanii medusavirus (*Medusaviridae*) functional/temporal classification. Figure S1: Comparative analysis of gene function and temporal classification among different members of *Nucleocytoviricota*. A) DNA replication, recombination and repair; B) Host-virus interaction; C) Miscellaneous; D) Nucleotide metabolism; E) Other metabolic functions; F) Signal transduction regulation; G) Transcription and RNA processing; H) Translation; I) Virion structure and morphogenesis

Author Contributions: FGS, RALR performed analyses; JSA, RALR designed the study; FGS, RALR wrote the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAP-PEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais).

Acknowledgments: We would like to thank our colleagues from GEPVIG (Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes) and Laboratório de Vírus of Universidade Federal de Minas Gerais for fruitful discussion around this research topic.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interests.

References

1. Yutin, N.; Wolf, Y.I.; Raoult, D.; Koonin, E. V Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virol. J.* **2009**, *6*, 223, doi:10.1186/1743-422X-6-223.
2. Iyer, L.M.; Aravind, L.; Koonin, E. V Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses. *J. Virol.* **2001**, *75*,

- 11720–11734, doi:10.1128/JVI.75.23.11720.
3. Koonin, E. V.; Yutin, N. Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. In *Advances in Virus Research*; 2019; Vol. 103, pp. 167–202 ISBN 9780128177228.
 4. Guglielmini, J.; Woo, A.; Krupovic, M.; Forterre, P.; Gaia, M. Diversification of giant and large eukaryotic dsDNA viruses predated the origin of modern eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 19585–19592, doi:10.1101/455816.
 5. Koonin, E. V.; Dolja, V. V.; Krupovic, M.; Varsani, A.; Wolf, Y.I.; Yutin, N.; Zerbini, F.M.; Kuhn, J.H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2020**, *84*, e00061-19, doi:10.1128/mmbr.00061-19.
 6. Philippe, N.; Legendre, M.; Dautre, G.; Couté, Y.; Poirot, O.; Lescot, M.; Arslan, D.; Seltzer, V.; Bertaux, L.; Bruley, C.; et al. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science (80-.)*. **2013**, *341*, 281–6, doi:10.1126/science.1239181.
 7. Reteno, D.G.; Benamar, S.; Khalil, J.B.; Andreani, J.; Armstrong, N.; Klose, T.; Rossmann, M.; Colson, P.; Raoult, D.; La Scola, B. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6585–94, doi:10.1128/JVI.00115-15.
 8. Bajrai, L.H.; Benamar, S.; Azhar, E.I.; Robert, C.; Levasseur, A.; Raoult, D.; La Scola, B. Kaumoebavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses* **2016**, *8*, doi:10.3390/v8110278.
 9. Andreani, J.; Aherfi, S.; Khalil, J.Y.B.; Di Pinto, F.; Bitam, I.; Raoult, D.; Colson, P.; La Scola, B. Cedratvirus, a double-cork structured giant virus, is a distant relative of pithoviruses. *Viruses* **2016**, *8*, 1–11, doi:10.3390/v8110300.
 10. Legendre, M.; Lartigue, A.; Bertaux, L.; Jeudy, S.; Bartoli, J.; Lescot, M.; Alempic, J.-M.; Ramus, C.; Bruley, C.; Labadie, K.; et al. In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y-old giant virus infecting Acanthamoeba. *Pnas* **2015**, *112*, 5327–5335, doi:10.1073/pnas.1510795112.
 11. Legendre, M.; Bartoli, J.; Shmakova, L.; Jeudy, S.; Labadie, K.; Adrait, A.; Lescot, M.; Poirot, O.; Bertaux, L.; Bruley, C.; et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 201320670, doi:10.1073/pnas.1320670111.
 12. Andreani, J.; Khalil, J.Y.B.; Sevvana, M.; Benamar, S.; Di Pinto, F.; Bitam, I.; Colson, P.; Klose, T.; Rossmann, M.G.; Raoult, D.; et al. Pacmanvirus, a New Giant Icosahedral Virus at the Crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00212-17, doi:10.1128/jvi.00212-17.
 13. Andreani, J.; Khalil, J.Y.B.; Baptiste, E.; Hasni, I.; Michelle, C.; Raoult, D.; Levasseur, A.; La Scola, B. Orpheovirus IHUMI-LCC2: A new virus among the giant viruses. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*, 1–11, doi:10.3389/fmicb.2017.02643.

14. Yoshikawa, G.; Blanc-Mathieu, R.; Song, C.; Kayama, Y.; Mochizuki, T.; Murata, K.; Ogata, H.; Takemura, M. Medusavirus, a Novel Large DNA Virus Discovered from Hot Spring Water. *J. Virol.* **2019**, *93*, 717 doi:10.1128/jvi.02130-18.
15. Abergel, C.; Legendre, M.; Claverie, J.M. The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 779–796, doi:10.1093/femsre/fuv037.
16. Oliveira, G.; Andrade, A.; Rodrigues, R.; Arantes, T.; Boratto, P.; Silva, L.; Dornas, F.; Trindade, G.; Drumond, B.; La Scola, B.; et al. Promoter Motifs in NCLDVs: An Evolutionary Perspective. *Viruses* **2017**, *9*, 16, 722 doi:10.3390/v9010016.
17. Hager, G.L.; McNally, J.G.; Misteli, T. Transcription dynamics. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 741–53.
18. Broyles, S.S.; Knutson, B.A. Poxvirus transcription. *Future Virol.* **2010**, *5*, 639–650, doi:10.2217/fvl.10.51.
19. Kogenaru, S.; Qing, Y.; Guo, Y.; Wang, N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics* **2012**, *13*, 1, doi:10.1186/1471-2164-13-629.
20. Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 57–63.
21. Nagalakshmi, U.; Waern, K.; Snyder, M. RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. In *Current Protocols in Molecular Biology*; 2010; pp. 1–13.
22. Broyles, S.S. Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2293–2303.
23. Vorou, R.M.; Papavassiliou, V.G.; Pierroutsakos, I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2008**, *21*, 153–6.
24. Claverie, J.M.; Abergel, C. Mimivirus: The emerging paradox of quasi-autonomous viruses. *Trends Genet.* **2010**, *26*, 431–437, doi:10.1016/j.tig.2010.07.003.
25. Yang, Z.; Reynolds, S.E.; Martens, C.A.; Bruno, D.P.; Porcella, S.F.; Moss, B. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 9899–908, doi:10.1128/JVI.05446-11.
26. Cassetti, M.A.; Moss, B. Interaction of the 82-kDa subunit of the vaccinia virus early transcription factor heterodimer with the promoter core sequence directs downstream DNA binding of the 70-kDa subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 7540–5.
27. Mohamed, M.R.; Niles, E.G. The viral RNA polymerase H4L subunit is required for Vaccinia virus early gene transcription termination. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20758–65.
28. Ahn, B.Y.; Gershon, P.D.; Moss, B. RNA polymerase-associated protein Rap94 confers promoter specificity for initiating transcription of vaccinia virus early stage genes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7552–7.
29. Moss, B. Poxviridae. In *Fields Virology*; Knipe, D., Howley, P., Eds.; Lippincott, Williams and Wilkins:

- Philadelphia, 2014; p. 2129.
30. Rosales, R.; Sutter, G.; Moss, B. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 3794–8.
 31. Katsafanas, G.; Moss, B. Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52210–7.
 32. Wright, C.F.; Oswald, B.W.; Dellis, S. Vaccinia Virus Late Transcription Is Activated in Vitro by Cellular Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40680–6.
 33. Gunasinghe, S.K.; Hubbs, A.E.; Wright, C.F. A vaccinia virus late transcription factor with biochemical and molecular identity to a human cellular protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27524–30.
 34. Bourquain, D.; Dabrowski, P.W.; Nitsche, A. Comparison of host cell gene expression in cowpox, monkeypox or vaccinia virus-infected cells reveals virus-specific regulation of immune response genes. *Virol. J.* **2013**, *10*, 61.
 35. Cackett, G.; Matelska, D.; Sýkora, M.; Portugal, R.; Malecki, M.; Bähler, J.; Dixon, L.; Werner, F. The African Swine Fever Virus Transcriptome. *J. Virol.* **2020**, *94*, 1–22, doi:10.1128/jvi.00119-20.
 36. Rodríguez, J.M.; Salas, M.L. African swine fever virus transcription. *Virus Res.* **2013**, *173*, 15–28.
 37. Papp, T.; Marschang, R.E. Detection and characterization of invertebrate iridoviruses found in reptiles and prey insects in Europe over the past two decades. *Viruses* **2019**, *11*, 600.
 38. Williams, T.; Barbosa-Solomieu, V.; Chinchar, V.G. A decade of advances in iridovirus research. *Adv. Virus Res.* **2005**, *65*, 173–248.
 39. Chinchar, V.G.; Yu, K.H.; Jancovich, J.K. The molecular biology of frog virus 3 and other iridoviruses infecting cold-blooded vertebrates. *Viruses* **2011**, *3*, 1959–85.
 40. Goorha, R. Frog virus 3 requires RNA polymerase II for its replication. *J. Virol.* **1981**, *37*, 496–9.
 41. Majji, S.; Thodima, V.; Sample, R.; Whitley, D.; Deng, Y.; Mao, J.; Chinchar, V.G. Transcriptome analysis of Frog Virus 3, the type species of the genus Ranavirus, family Iridoviridae. *Virology* **2009**, *391*, 293–303.
 42. Lua, D.T.; Yasuike, M.; Hirono, I.; Aoki, T. Transcription program of red sea bream iridovirus as revealed by DNA microarrays. *J. Virol.* **2005**, *79*, 15151–64.
 43. D’Costa, S.M.; Yao, H.J.; Bilimoria, S.L. Transcriptional mapping in Chilo iridescent virus infections. *Arch. Virol.* **2004**, *149*, 723–42.
 44. Cheng, X.-W.; Wang, L.; Carner, G.R.; Arif, B.M. Characterization of three ascovirus isolates from cotton insects. *J. Invertebr. Pathol.* **2005**, *89*, 193–202.

- 777 45. Asgari, S.; Davis, J.; Wood, D.; Peter Wilson, A.M. Sequence and organization of the *Heliothis virescens* 778
ascovirus genome. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1120–1132.
- 779 46. Salem, T.Z.; Turney, C.M.; Wang, L.; Xue, J.; Wan, X.F.; Cheng, X.W. Transcriptional analysis of a major capsid 780
protein gene from *Spodoptera exigua* ascovirus 5a. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 149–162,
781 doi:10.1007/s00705-007-1081-3.
- 782 47. Zaghloul, H.A.H.; Hice, R.; Arensburger, P.; Federici, B.A. Transcriptome Analysis of the *Spodoptera* 783
frugiperda Ascovirus In Vivo Provides Insights into How Its Apoptosis Inhibitors and Caspase Promote
784 Increased Synthesis of Viral Vesicles and Virion Progeny. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00874-17.
- 785 48. Van Etten, J.L.; Agarkova, I. V.; Dunigan, D.D. Chloroviruses. *Viruses* **2019**, *12*, 20, doi:10.3390/v12010020.
- 786 49. Allen, M.J.; Schroeder, D.C.; Holden, M.T.G.; Wilson, W.H. Evolutionary history of the Coccolithoviridae. *Mol.*
787 *Biol. Evol.* **2006**, *23*, 86–92, doi:10.1093/molbev/msj010.
- 788 50. Yanai-Balser, G.M.; Duncan, G.A.; Eudy, J.D.; Wang, D.; Li, X.; Agarkova, I. V.; Dunigan, D.D.; Van Etten, J.L. 789
Microarray Analysis of *Paramecium bursaria* Chlorella Virus 1 Transcription. *J. Virol.* **2010**, *84*, 532–542,
790 doi:10.1128/jvi.01698-09.
- 791 51. Kawasaki, T.; Tanaka, M.; Fujie, M.; Usami, S.; Yamada, T. Immediate early genes expressed in chlorovirus 792
infections. *Virology* **2004**, *318*, 214–23.
- 793 52. Blanc, G.; Mozar, M.; Agarkova, I. V.; Gurnon, J.R.; Yanai-Balser, G.; Rowe, J.M.; Xia, Y.; Riethoven, J.J.; 794
Dunigan, D.D.; Van Etten, J.L. Deep RNA sequencing reveals hidden features and dynamics of early gene
795 transcription in *Paramecium bursaria* chlorella virus 1. *PLoS One* **2014**, *9*, e90989,
796 doi:10.1371/journal.pone.0090989.
- 797 53. Van Etten, J.L.; Graves, M. V.; Müller, D.G.; Boland, W.; Delaroque, N. Phycodnaviridae - Large DNA algal 798
viruses. *Arch. Virol.* **2002**, *147*, 1479–516.
- 799 54. Wilson, W.H.; Van Etten, J.L.; Allen, M.J. The Phycodnaviridae: The story of how tiny giants rule the world. 800
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **2009**, *328*, 1–42, doi:10.1007/978-3-540-68618-7-1.
- 801 55. Ku, C.; Ku, C.; Sheyn, U.; Sheyn, U.; Sebé-Pedrós, A.; Sebé-Pedrós, A.; Ben-Dor, S.; Schatz, D.; Tanay, A.; Tanay, 802
A.; et al. A single-cell view on alga-virus interactions reveals sequential transcriptional programs and infection
803 states. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, doi:10.1126/sciadv.aba4137.
- 804 56. Aylward, F.O.; Moniruzzaman, M.; Ha, A.D.; Koonin, E. V. A Phylogenomic Framework for Charting the 805
Diversity and Evolution of Giant Viruses. *bioRxiv* **2021**.
- 806 57. La Scola, B.; Audic, S.; Robert, C.; Jungang, L.; de Lamballerie, X.; Drancourt, M.; Birtles, R.; Claverie, J.-M.; 807
Raoult, D. A giant virus in amoebae. *Science* (80-.). **2003**, *299*, 2033, doi:10.1126/science.1081867.
- 808 58. Xiao, C.; Kuznetso, Y.G.; Sun, S.; Hafenstein, S.L.; Kostyuchenko, V.A.; Chipman, P.R.; Suzan-Monti, M.; 809
Raoult, D.; McPherson, A.; Rossmann, M.G. Structural studies of the giant Mimivirus. *PLoS Biol.* **2009**, *7*,

- 0958–0966, doi:10.1371-journal.pbio.1000092-S.
59. Zauberman, N.; Mutsafi, Y.; Halevy, D. Ben; Shimoni, E.; Klein, E.; Xiao, C.; Sun, S.; Minsky, A. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, 1104–1114, doi:10.1371/journal.pbio.0060114.
 60. Raoult, D.; Audic, S.; Robert, C.; Abergel, C.; Renesto, P.; Ogata, H.; Scola, B. La; Suzan, M.; Claverie, J.-M. The 1.2-Megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* (80-.). **2004**, *306*, 1344–1350, doi:http://dx.doi.org/10.1126/science.1101485.
 61. Legendre, M.; Audic, S.; Poirot, O.; Hingamp, P.; Seltzer, V.; Byrne, D.; Lartigue, A.; Lescot, M.; Bernadac, A.; Poulain, J.; et al. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. *Genome Res.* **2010**, *20*, 664–674, doi:10.1101/gr.102582.109.
 62. Legendre, M.; Santini, S.; Rico, A.; Abergel, C.; Claverie, J.-M. Breaking the 1000-gene barrier for Mimivirus using ultra-deep genome and transcriptome sequencing. *Virol. J.* **2011**, *8*, 99, doi:10.1186/1743-422X-8-99.
 63. Boyer, M.; Yutin, N.; Pagnier, I.; Barrassi, L.; Fournous, G.; Espinosa, L.; Robert, C.; Azza, S.; Sun, S.; Rossmann, M.G.; et al. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 21848–21853, doi:10.1073/pnas.0911354106.
 64. Rodrigues, R.A.L.; Louazani, A.C.; Picorelli, A.; Oliveira, G.P.; Lobo, F.P.; Colson, P.; La Scola, B.; Abrahão, J.S. Analysis of a Marseillevirus Transcriptome Reveals Temporal Gene Expression Profile and Host Transcriptional Shift. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2020.00651.
 65. Zhang, R.; Endo, H.; Takemura, M.; Ogata, H. RNA-seq of the medusavirus suggests remodeling of the host nuclear environment at an early infection stage. *bioRxiv* **2021**.
 66. Gruffat, H.; Marchione, R.; Manet, E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 869.
 67. Friesen, P.D.; Miller, L.K. Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts. *J. Virol.* **1985**, *54*, 392–400.
 68. Yang, H.; Ma, Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Shen, W.; Chen, X. Transcription regulation mechanisms of bacteriophages. *Bioengineered* **2014**, *5*, 300–304, doi:10.4161/bioe.32110.
 69. Yutin, N.; Wolf, Y.I.; Koonin, E. V. Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology* **2014**, *466–467*, 38–52, doi:10.1016/j.virol.2014.06.032.
 70. Nasir, A.; Caetano-Anollés, G. A phylogenomic data-driven exploration of viral origins and evolution. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500527, doi:10.1126/sciadv.1500527.
 71. Koonin, E. V.; Krupovic, M.; Yutin, N. Evolution of double-stranded DNA viruses of eukaryotes: From bacteriophages to transposons to giant viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1341*, 10–24, doi:10.1111/nyas.12728.

72. Koonin, E. V.; Dolja, V. V.; Krupovic, M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* **2015**, *479–480*, 2–25, doi:10.1016/j.virol.2015.02.039.
73. Rodrigues, R. AL; de Souza, F.G.; de Azevedo, B.L.; da Silva, L.C.; Abrahão, J.S. The morphogenesis of different giant viruses as additional evidence for a common origin of Nucleocytoviricota. *Curr. Opin. Virol.* **2021**, *49*, 102–110, doi:10.1016/j.coviro.2021.05.004.
74. Fornelos, N.; Browning, D.F.; Pavlin, A.; Podlessek, Z.; Hodnik, V.; Salas, M.; Butala, M. Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 9432–9443, doi:10.1093/nar/gky646.
75. Filée, J. Genomic comparison of closely related Giant Viruses supports an accordion-like model of evolution. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–13, doi:10.3389/fmicb.2015.00593.
76. Zhao, X.; Chen, C.; Shen, W.; Huang, G.; Le, S.; Lu, S.; Li, M.; Zhao, Y.; Wang, J.; Rao, X.; et al. Global Transcriptomic Analysis of Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and Bacteriophage PaP3. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12, doi:10.1038/srep19237.

ANEXO II. Outros trabalhos publicados



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment



Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: A potential tool for monitoring the circulation of infected patients



Jônatas Santos Abrahão^{a,*}, Livia Sacchetto^a, Izabela Maurício Rezende^a, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues^{a,b,*}, Ana Paula Correia Crispim^a, César Moura^a, Diogo Correa Mendonça^a, Erik Reis^a, Fernanda Souza^a,

Gabriela Fernanda Garcia Oliveira^a, Iago Domingos^a, Paulo Victor de Miranda Boratto^a,

Pedro Henrique Bastos Silva^a, Victoria Fulgêncio Queiroz^a, Talita Bastos Machado^a, Luis Adan Flores Andrade^a, Karine Lima Lourenço^a, Thaís Silva^c, Grazielle Pereira Oliveira^a, Viviane de Souza Alves^a, Pedro Augusto Alves^c,

Erna Geessien Kroon^a, Giliane de Souza Trindade^a, Betânia Paiva Drumond^a

^a Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

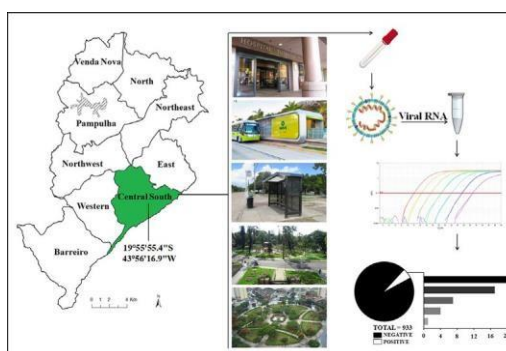
^b Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^c René Rachou Institute – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

HIGHLIGHTS

- COVID-19 has caused over 4.4 million cases in Brazil by the end of September 2020.
- The presence of SARS-CoV-2 in public surfaces can result in new infections.
- RT-qPCR was used for assessing the presence of viral genome in the environment.
- SARS-CoV-2 was detected especially in surfaces near hospitals and public squares.
- Constant surveillance of the virus in the environment is essential for disease control.

GRAPHICAL ABSTRACT



article info

Article history:

Received 30 July 2020

Received in revised form 22 September 2020/Accepted 23 September 2020

Available online 2 October 2020 Editor: Jay Gan

Keywords:

COVID-19

Coronavirus Genome detection

Environmental surveillance

abstract

The world is experiencing the worst global health crisis in recent decades since December/2019 due to a new pandemic coronavirus. The COVID-19 disease, caused by SARS-CoV-2, has resulted in more than 30 million cases and 950 thousand deaths worldwide as of September 21, 2020. Determining the extent of the virus on public surfaces is critical for understanding the potential risk of infection in these areas. In this study, we investigated the presence of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area in Brazil. Forty-nine of 933 samples tested positive (5.25%) for SARS-CoV-2 RNA, including samples collected from distinct material surfaces,

including metal and concrete, and distinct places, mainly around hospital care units and public squares. Our data indicated the contamination of public surfaces by SARS-CoV-2, suggesting the circulation of infected patients and the risk of infection for the population. Constant monitoring of the virus in urban areas is required as a strategy to fight the pandemic and prevent further infections.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

** Correspondence to: R.A.L. Rodrigues, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: jonasabralha@gmail.com, jca@cb.ufmg.br (J.S. Abrahão), ralrodriguesr407@gmail.com (R.A.L. Rodrigues).

1. Introduction

Since late December 2019, the world is experiencing the worst global health crisis in recent decades due to the ongoing transmission of a novel coronavirus. The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) spread globally and affected several sectors, including those related to medicine, economics, and politics, among others (Cutler, 2020; Gorbalenya et al., 2020; Lai et al., 2020; Zhu et al., 2020). COVID-19 has already affected over 200 countries, resulting in more than 30.6 million cases and 950 thousand deaths worldwide as of September 21, 2020 (WHO, 2020). In Brazil, the first official case was registered on February 26, 2020, and more than 4,490,000 confirmed cases and 135,000 deaths had been registered across the country as of September 21, 2020 (WHO, 2020).

Belo Horizonte is the capital of Minas Gerais State, one of Brazil's most populous metropolitan regions (6 million inhabitants). The city recorded 39,379 confirmed cases and 168 deaths due to COVID-19 as of September 21 (Secretaria Municipal de Saúde, 2020). The areas within Belo Horizonte where most of the deaths and confirmed cases have occurred correspond precisely to areas with public squares, bus stations/terminals, and hospital areas, i.e., where a large flow and concentration of people is commonly observed (Secretaria Municipal de Saúde, 2020). Recent studies have identified the presence of SARS-CoV-2 RNA on different surfaces and environments inside hospitals, revealing the dynamics of viral dissemination within these places (Guo et al., 2020; Liu et al., 2020; Wang et al., 2020). SARS-CoV-2 remains viable on different types of surfaces, such as metal and plastic, for up to 72 h, depending on the type of surface material, and can remain infectious in aerosols for at least 3 h (Van Doremalen et al., 2020). Assessing the presence of the virus in the environment, objects, and surfaces in public areas is fundamental for understanding the risk of infection in the population. In addition, any information gained can be used by health managers to control population movements in these areas, as well as implement environmental disinfection measures.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

We investigated the presence of SARS-CoV-2 RNA in a downtown area of Belo Horizonte between April and June 2020, in a total of nine days. Belo Horizonte's climate is classified as tropical with a dry season, with moderately hot and humid summers and dry and pleasant winters. The temperature is mild throughout the year, with averages ranging from 19 °C to 24 °C, with the annual compensated average of 22 °C and 1430 mm is the average annual rainfall (INMET, 2020). All samples were collected between 14:00 pm and 17:00 pm. Temperature was between 20 °C to 25 °C (average temperature 22 °C) and relative humidity varying between 36% to 83% (average humidity 54%). Environmental data was retrieved from Time and Date AS website (<https://www.timeanddate.com/weather/brazil/belo-horizonte/>). This region of the city (central-southeast: 19°55'55.4"S 43°56'16.9"W) has the highest concentration of hospitals and health units and one of the highest number of notified COVID-19 cases. Importantly, this part of the city also has a large number of people accessing public transportation and transportation facilities daily. A total of 933 samples were collected from eight different categories of places (Supplementary Table 1), including:

a) 38 health care units (hospitals, medical centers, and emergency care units); b) 17 public squares; c) two public parks; d) one public market; e) six bus terminals; f) one shopping mall; g) 10 education centers (universities and schools); h) 21 other public places, including banks, government departments, among others (Supplementary Table 1). Samples were collected from different sources including entrance doors, handrails, benches and tables, bus stops, and ground, and from distinct materials, including concrete, metal, rock, brickwork, and others. For the collection of environmental samples, swabs with

sterile phosphate-buffered saline were vigorously rubbed on surfaces (10 cm²) of the aforementioned local and objects. The swabs were then transferred to tubes containing transport solution (1 mL of guanidine isothiocyanate buffer, 4 M) and taken directly to the laboratory for testing.

2.2. RNA extraction and RT-qPCR

For each sample, 70 µL of transport solution containing a sample was submitted to nucleic acid extraction using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Maryland, USA). Total RNA (5 µL) was used as a template for one-step qPCR (Promega, Wisconsin, USA) in a final volume of 20 µL per reaction, GoTaq1-sept qPCR system, Promega), using primers and probes specific for the N1 and N2 regions of the SARS-CoV-2 genome (CDC, USA 2020). RNA extraction was performed in batches of 13 samples plus one negative control. Samples were considered positive when they presented amplification for N1 and N2 targets region, considering the threshold for cycle quantification value (Cq) of 40 (CDC, USA 2020). Since between the range of 37–40 Cq indicate minimal quantities of DNA, Cq ≥ 40 were considered negative. The results of RT-qPCR runs were manually inspected for the correction of baseline and threshold parameters whenever necessary due to heterogeneity in the amount of input RNA among different samples (Bustin et al., 2009). Negative (extraction control and non-template control) and positive controls (RNA extracted from inactivated SARS-CoV-2, kindly provided by Dr. Danielle Durigon and Dr. Edison Durigon, USP, Brazil and Dr. Rafael Elias Marques (Centro Nacional de Biotecnologia LNBio-CNPq) were used. To confirm the results, all positive samples were submitted to a second round of RNA extraction and RT-qPCR. Quantification of viral RNA in the environmental samples was based on a standard curve generated from serial dilutions (10) of SARS-CoV-2 RNA and converted to genomic units per ten square centimeters of surface (the area we made the sampling for this study). To date, for PCR quantification (based on standard curve) we considered 1 SARS-CoV-2 plaque forming unit as 1 SARS-CoV-2 genomic unit. Quantification was based only on N1 target gene given the high efficiency of our standard curve (Supplementary Fig. 1). N2 target gene quantification was not performed due to a low efficiency achieved for the standard curve for this target. Nevertheless, the Cq values for N2 target for all positive samples are included in supplementary Table 2. SARS-CoV-2 RNA control was previously quantified as described elsewhere (de Almeida et al., 2020).

3. Results

A total of 49 samples (5.25%) were positive for the presence of SARS-CoV-2 RNA (Table 1 and Fig. 1). SARS-CoV-2 RNA was detected in 20 samples collected around health care units, corresponding to 40.8% of the total positive samples, with Ct values ranging from 23.3 to 37.7 (N1) and 22.2 to 39.4 (N2). These samples are distributed in 12 different health care units and were detected mainly at bus stops near the entrance of the hospitals and emergency care units (Supplementary Table 1). Seventeen samples were positive for SARS-CoV-2 RNA at public squares distributed across seven different places, corresponding to 34.7% of the positive samples found in this study. Most of the positive samples were detected in benches, with Ct values ranging from 32 to 37.5 (N1) and 34.4 to 39 (N2). We also detected SARS-CoV-2 in different bus terminals in the city, being seven positive samples (14.3%) with Ct values ranging from 29 to 34.7 (N1) and 30.5 to 38.5 (N2). All of these samples were collected at entrance handrails of the bus terminals (Table 1). Finally, we detected the presence of SARS-CoV-2 RNA at very low concentration in one sample collected in the wall of the major public market of the city (N1 Ct = 36.9; N2 Ct = 39.6), and four samples collected at bus stops [floor (1) and benches (3)] in front of public banks (2), sport club (1), and a government department (1), with Ct values ranging from 34.7 to 38.1 (N1) and 37.8 to 39.5 (N2) (Table 1 and Supplementary Table 1). After RNA quantification, we

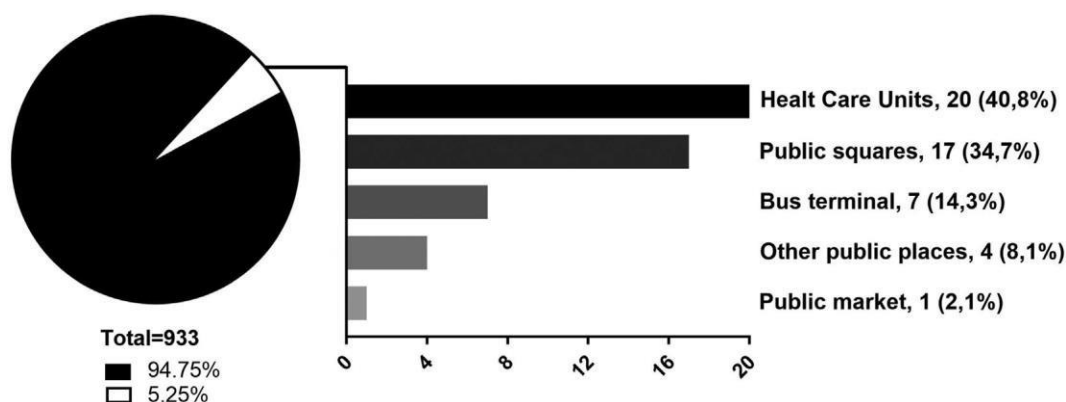


Fig. 1. Distribution of positive samples for SARS-CoV-2 RNA. 933 samples were collected at different locations in Belo Horizonte, Brazil, with 49 being positive for viral genome detection, distributed among five different categories of locations. Raw numbers and percentages are indicated.

observed that most positive samples had very low viral amount (≤ 1 genomic unit/ 10 cm^2), and the higher viral load were detected in samples collected from health care units (Table 1).

It is important to mention that samples were not collected evenly among the different categories of places. Most of the samples were collected from health care units (403 samples, 43.2%) and public squares (269 samples, 28.8%) (Supplementary Fig. 2), and it can be the reason why over 3/4 of positive samples were detected from samples collected at these locations. Considering the proportion of positivity in the different places, bus terminals exhibit the higher positivity rate among the evaluated places, followed by public market, public squares, and health care units. The Belo Horizonte City Hall was informed about the contaminated areas, and, after disinfection (laundry detergent followed by 1% sodium hypochlorite), viral RNA could no longer be detected, except for one sample recollected at the entrance of a hospital. We did not identify any positive samples in public parks, education centers, and a mall that were included in this study.

Samples were collected from different materials, the majority being from concrete (383 samples, 41.1%) and metal (282 samples, 30.2%), and also rock, brickwork, wood, glass, and a minority of other materials, including plastic and pottery (10 samples each) and asphalt (4 samples) (Fig. 2A). From the 49 positive samples, 20 were identified in metal surfaces, especially from benches of bus stops and handrails of hospitals

entrances and bus terminals (Fig. 2B and Supplementary Table 1). Fourteen positive samples were recovered from concrete surfaces, mainly sidewalks near health care units and public squares (Figs. 2B and 3). Nine positive samples were found in rock surfaces, all being found in public squares but one sampled from a frontal pillar of a hospital (Fig. 3). SARS-CoV-2 RNA was also identified in two samples collected from brickwork (one from health care unit and other from a public square), and in two plastic surfaces from benches of an emergency care unit (Fig. 3 and Supplementary Table 1). Finally, SARS-CoV-2 RNA was detected in one sample from a wood bench located in a public square, and one sample from a glass surface in a bus stop in front of a hospital (Figs. 2B and 3).

4. Discussion

Although we sought to detect the presence of viral RNA, not infectious particles, it is possible that infectious particles were present in these environments, and care must be taken to avoid further contamination and the eventual collapse of the local health system. The infectious dose of SARS-CoV-2 virions to start a productive infection in humans is still unclear, and also if infectious particles can be recovered from surfaces with low viral load. Previous studies have reported the isolation of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and oropharyngeal samples from distinct patients in a nursing facility (USA) with high Ct

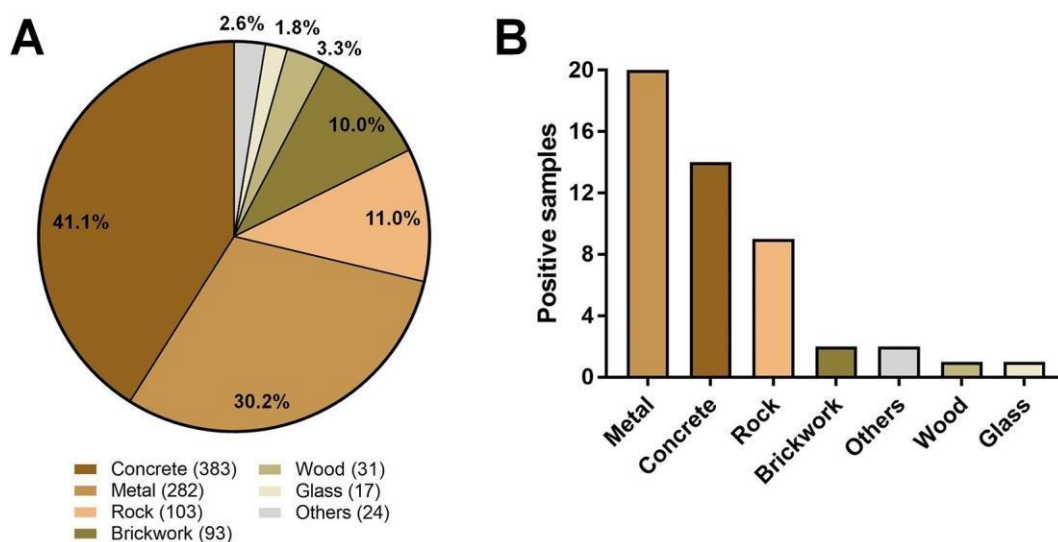


Fig. 2. Environmental samples collected from different materials. (A) Distribution of samples collected in different surfaces. Raw numbers of samples are indicated in front of the materials names; (B) Distribution of positive samples among different kinds of materials.

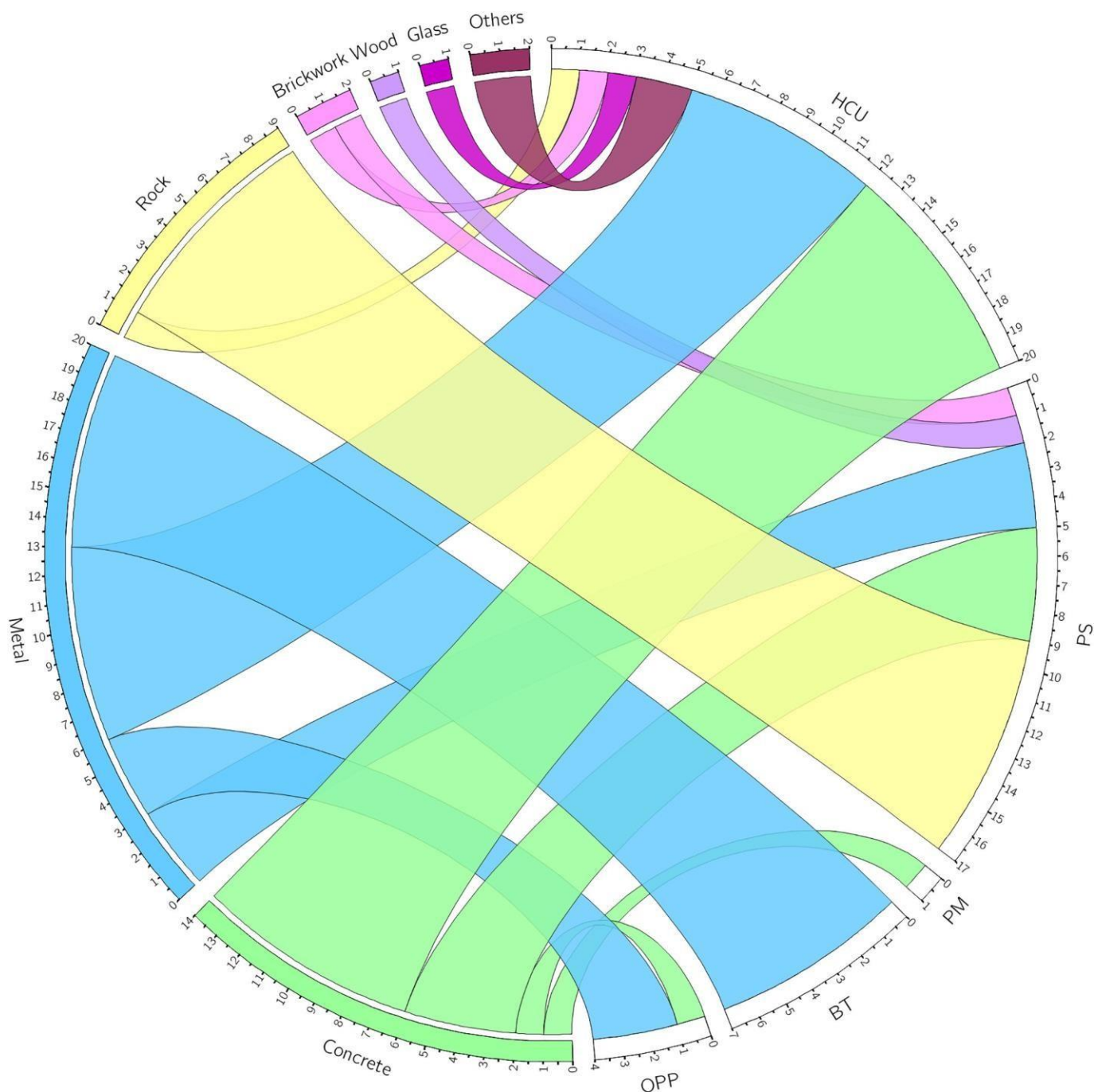


Fig. 3. Association between locations and materials of positive samples for SARS-CoV-2 RNA. Chord plot associating locations and surface materials of positive samples. HCU: health care units; PS: public squares; PM: public market; BT: bus terminals; OPP: other public places.

value (≤ 34) (Arons et al., 2020). Furthermore, other studies have reported the recovery of the virus from different surfaces, including metal, cardboard, and plastic (Van Doremalen et al., 2020). Different studies have reported the detection of SARS-CoV-2 genome in different environmental surfaces, especially inside hospital facilities, suggesting that environmental contamination by the virus is possible (Carraturo et al., 2020; Chia et al., 2020; Jiang et al., 2020; Wu et al., 2020; Yet et al., 2020). Chin and coworkers observed that SARS-CoV-2 remains viable in smooth surfaces from distinct materials, including metal and plastic, up to 4 days at 22 °C and humidity around 65% (Chin et al., 2020). Therefore, it is possible that infectious particles could also be recovered from the surfaces found positive for the virus RNA in this study, especially considering that around 40% of the positive samples

identified in this study had Ct values below 34. Although the real infectious potential of viruses detected in this study cannot be established, we believe the detection of SARS-CoV-2 by molecular assays indicates the potential risk of infection, and care must be taken to avoid further increases in the number of COVID-19 cases. It is important to mention that most of the positive samples in our study had very low amount of RNA (≤ 1 genomic unit/cm²) and such amount of virus might not be able to trigger COVID-19 in patients. Nevertheless, the viral RNA in different surfaces was detected in our assays, despite the low concentration, and care must be taken to avoid possible infection.

Although Belo Horizonte has relatively few cases when compared with other cities in Brazil, such as São Paulo and Rio de Janeiro, our data reinforce that the virus is circulating in the city and can be found

Table 1

Positive samples for SARS-CoV-2 RNA in surfaces at different locations in Bdo Horizonte, Brazil.

Category	SampleID	Surface (material)	Ct value (Nt)	Concentration (Nt) (genomic units/10 cm ²)
Health care units	HCU 29C	Wall (brickwork)	25.9	67.9
	HCU 2 B	Floor (concrete)	34.1	≤1
	HCU 3 N	Floor (concrete)	37.2	≤1
	HCU 8 A	Floor (concrete)	28.5	11.7
	HCU 12 E	Floor (concrete)	37.7	≤1
	HCU 13 J	Wall (concrete)	34.5	≤1
	HCU 29 A	Sidewalk (concrete)	34.2	≤1
	HCU 29 M	Sidewalk (concrete)	36.8	≤1
	HCU 30C	Floor (concrete)	36.2	≤1
	HCU 3 D	Bench (metal)	34.1	≤1
	HCU 3 I	Bench (metal)	34	≤1
	HCU 1 D	Bench (metal)	31.6	≤1
	HCU 9 H	Bench (metal)	36.7	≤1
	HCU 11 C	Handrail (metal)	36.4	≤1
	HCU 9 A	Bench (metal)	33.1	≤1
	HCU 13 E	Bench (metal)	36.9	≤1
	HCU 21 D	Pillar (rock)	36	≤1
	HCU 29 F	Bench (plastic)	23.7	299.8
	HCU 29 H	Bench (plastic)	23.3	392.8
	HCU 12 D	(glass)	36	≤1
Public squares	PS 18 R	Wall (brickwork)	37.4	≤1
	PS 1 E	Table (concrete)	33.1	≤1
	PS 3 C	Bench (concrete)	35.8	≤1
	PS 6 G	Bench (concrete)	37.5	≤1
	PS 18 X	Sidewalk (concrete)	35.4	≤1
	PS 15 F	Bench (wood)	34.8	≤1
	PS 3 K	Bench (metal)	35.7	≤1
	PS 17 J	Handrail (metal)	36.5	≤1
	PS 18 I	Handrail (metal)	35.1	≤1
	PS 2 G	Bench (rock)	35.6	≤1
	PS 2 H	Bench (rock)	34	≤1
	PS 2 I	Bench (rock)	33.9	≤1
	PS 9 C	Bench (rock)	35.5	≤1
	PS 17 A	Bench (rock)	32.3	≤1
	PS 17 D	Bench (rock)	32	≤1
	PS 17 E	Bench (rock)	34	≤1
	PS 18 M	Bench (rock)	36.9	≤1
Bus terminals	BT 1 A	Handrail (metal)	32.8	≤1
	BT 1 B	Handrail (metal)	34.5	≤1
	BT 1 C	Handrail (metal)	29	8.4
	BT 1 Q	Handrail (metal)	32.1	≤1
	BT 1 S	Handrail (metal)	32.8	≤1
	BT 1 W	Handrail (metal)	29	8.4
	BT 2 D	Handrail (metal)	34.7	≤1
Other public places	OPP 11 C	Floor (concrete)	36.7	≤1
	OPP 5 A	Bench (metal)	36.2	≤1
	OPP 10 A	Bench (metal)	38.1	≤1
	OPP 11 A	Bench (metal)	34.7	≤1
Public market	PM 1 G	Wall (concrete)	36.9	≤1

For PCR quantification, we consider 1 SARS-CoV-2 plaque forming unit as 1 SARS-CoV-2 genomic unit.

on surfaces such as benches, tables, handrails, and floors, and in places with a large flow of people, such as public squares and hospital entrances. The detection of the viral RNA at these sites indicates that adequate cleaning of public environments and reinforcement of educational campaigns for hygienic and social distancing practices should be undertaken. Given the short sampling period in this study, our data do not support a correlation between different environmental parameters, such as local temperature or humidity, and the detection of the virus. Nevertheless, other studies addressed this matter and suggested that SARS-CoV-2 remains viable for up to 7 days at 22 °C, precisely the average temperature in the days we made the sampling for virus detection for this study (Chin et al., 2020). Furthermore, in our work, a mean of 54% of humidity was observed, and another human coronavirus, HCoV-229E, was more stable at 50% of humidity, a similar humidity value (Kampf et al., 2020). These data support the indication that viable viruses could be recovered from places where we detected the viral RNA. Further studies may contribute to elucidate better how frequent we can isolate SARS-CoV-2 from inanimate surfaces in the field.

It is important to notice that the transmission of the virus in buses seems to be considerably high, as demonstrated in China, where in a

bus with 68 individuals, one person in a 100 min trip disseminated the virus to another 23 passengers (Shen et al., 2020). Although we did not evaluate the presence of the virus inside the buses of our city, the detection in the bus terminals and stations is an indicative that those places are an important risk factor for people to get infected, not only inside the buses. Our study highlights the need for the constant assessment of the presence of the virus, not only in hospital facilities, but also in places close to medical areas and with a large circulation of people. The presence of SARS-CoV-2 in these environments can result in an increase in the number of cases of the disease in the near future if control measures are not forcefully adopted.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645>.

CRediT authorship contribution statement

Jônatas Santos Abrahão: Conceptualization, Supervision, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing. Lívia Sacchetto: Investigation, Writing - review & editing. Izabela Maurício Rezende: Investigation. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues: Investigation, Visualization,

Writing - original draft, Writing - review & editing. Ana Paula Correia Crispim: Investigation. César Moura: Investigation. Diogo Correia Mendonça: Investigation. Erik Reis: Investigation, Writing - review & editing. Fernanda Souza: Investigation. Gabriela Fernanda Garcia Oliveira: Investigation. Iago Domingos: Investigation. Paulo Victor de Miranda Boratto: Investigation. Pedro Henrique Bastos Silva: Investigation. Victoria Fulgêncio Queiroz: Investigation. Talita Bastos Machado: Investigation. Luis Adan Flores Andrade: Investigation. Karine Lima Lourenço: Investigation. Thaís Silva: Investigation. Grazielle Pereira Oliveira: Investigation. Viviane de Souza Alves: Conceptualization, Writing - original draft. Pedro Augusto Alves: Investigation. Erna Geessien Kroon: Conceptualization, Writing - original draft. Giliane de Souza Trindade: Conceptualization, Writing - original draft. Betânia Paiva Drumond: Conceptualization, Supervision, Writing - original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank our colleagues from Bdo Horizonte City Hall, in especial Coronel Genedempsey Bicalho Cruz (Superintendência de Limpeza Urbana – SLU/BH). In addition, we thank the Gabinete da Reitora da UFMG, the Pró Reitoria de Pesquisa da UFMG/Secretaria de Educação Superior/Ministério da Educação (number 23072.21119/2020-10), Finep/RTR/PRPq/Rede COVID-19 (number 0494/20-0120002600), Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais) for their financial support. B.P.D, E.G.K., G.S.T. and J.S.A. are CNPq researchers. J.S.A. and P.A.A. are members of Rede Virus MCTIC.

References

- Arnos MM, Haddad KM, Reddy SC, Kimbal A, James A, Jacobs JR, Taylor J, Spiar, K, Bardessy AC, Oakley LP, Tamer S, Dyal JW, Harvey J, Chisly Z, Bl M, Mettner M, Paul P, Carlson CM, McLaughlin HP, Thornburg N, Tong S, Tamin A, Tao Y, Uehara A, Harcourt J, Clark S, Brostrom-Smith C, Page LC, Kay M, Lewis J, Montgomery P, Store ND, Clark TA, Horien MA, Duckin JS, Jirigan JA, 2020. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N. Engl. J. Med.* 382, 2081–2090. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2008457>.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 61–622. <https://doi.org/10.1373/jclinchem.2008.112797>.
- Carraro F, Di Giudea C, Mordì M, Cerulli V, Libralati G, Galdieri E, Guida M, 2020. Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environ. Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115010>.
- Centers for Disease Control and Prevention Division of Viral Diseases, 2020. CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel.
- Chia, P.Y., Coleman, K.K., Tan, Y.K., Ong, S.W.X., Gum, M., Lau, S.K., Lim, X.F., Lim, A.S., Sutjipto, S., Lee, P.H., Son, T.T., Young, B.E., Milton, D.K., Gray, G.C., Schuster, S., Barkham, T., De, P.P., Vasoo, S., Chan, M., Ang, B.S.P., Tan, B.H., Leo, Y.S., Ng, O.T., Wong, M.S.Y., Marimuthu, K., Lye, D.C., Lim, P.L., Lee, C.C., Ling, L.M., Lee, L., Lee,

- T.H., Wong, C.S., Sadarangani, S., Lin, R.J., Ng, D.H.L., Sadasiv, M., Yeo, T.W., Choy, C.Y., Tan, G.S.E., Dimalatac, F., Santos, I.F., Go, C.J., Chan, Y.K., Tay, J.Y., Tan, J.Y.L., Pandit, N., Ho, B.C.H., Moudis, S., Chen, Y.Y.C., Abdad, M.Y., Moss, D., 2020. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2>.
- Chin, A.W.H., Chu, J.T.S., Perera, M.R.A., Hui, K.P.Y., Yen, H.-L., Chan, M.C.W., Peiris, M., Poon, L.L.M., 2020. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe.* [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30003-3](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30003-3).
- Cutler, D., 2020. How will COVID-19 affect the health care economy? *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* <https://doi.org/10.1001/jama.2020.7308>.
- de Almeida, P.R., Demoliner, M., Antunes Eisen, A.K., Heldt, F.H., Hansen, A.W., Schallenberg, K., Fleck, J.D., Spilki, F.R., 2020. SARS-CoV2 quantification using RT-dPCR: a faster and safer alternative to assist viral genomic copies assessment using RT-qPCR. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.072728>.
- Gorbunova, A.E., Baker, S.C., Baric, R.S., de Groot, R.J., Drosin, C., Gulyaeva, A.A., Haegmans, B.L., Lauber, C., Leontovich, A.M., Neuman, B.W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L.L.M., Samborskiy, D.V., Sidorov, I.A., Sida, I., Zidhr, J., 2020. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Guo, Z.D., Wang, Z.Y., Zhang, S.F., Li, X., Li, L., Li, C., Cui, Y., Fu, R.B., Dong, Y.Z., Chi, X.Y., Zhang, M.Y., Liu, K., Liu, K., Cao, C., Liu, B., Zhang, K., Gao, Y.W., Lu, B., Chen, W., 2020. Aerosol and surface distribution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in hospital wards, Wuhan, China, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1583–1591. <https://doi.org/10.3201/cid2607.200885>.
- INMET, 2020. Normas Climatológicas do Brasil. URL: <https://portal.inmet.gov.br/>.
- Jiang, F.C., Jiang, X.L., Wang, Z.G., Meng, Z.H., Shao, S.F., Anderson, B.D., Ma, M.J., 2020. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA on surfaces in quarantine rooms. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/cid2609.201435>.
- Kampf, G., Todt, D., Pfander, S., Steinmann, E., 2020. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J. Hosp. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>.
- Lai, J., Ma, S., Wang, Y., Cai, Z., Hu, J., Wei, N., Wu, J., Du, H., Chen, T., Li, R., Tan, H., Kang, L., Yao, L., Huang, M., Wang, H., Wang, G., Liu, Z., Hu, S., 2020. Factors associated with mental health outcomes among health care workers exposed to coronavirus disease 2019. *JAMA Netw. Open* <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.3976>.
- Liu, Yuan, Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Yingde, Gai, N.K., Sun, L., Duan, Y., Cai, J., Westerdahl, D., Liu, X., Xu, K., Ho, K.fai, Kan, H., Fu, Q., Lan, K., 2020. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2271-3>.
- Secretaria Municipal de Saúde, 2020. *Bol. epidemiol. e assist. - COVID-19 Nº 108/2020 (Belo Horizonte)*.
- Sten, Y., Li, C., Dong, H., Wang, Z., Martinez, L., Sun, Z., Handl, A., Chen, Z., Chen, E., Ebel, M.H., Wang, F., Yi, B., Wang, H., Wang, X., Wang, A., Chen, B., Qi, Y., Liang, L., Li, Y., Ling, F., Chen, J., Xu, G., 2020. Community outbreak investigation of SARS-CoV-2 transmission among bus riders in eastern China. *JAMA Intern. Med.* <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.5225>.
- Van Doremale, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Hübner, M.G., Gamble, A., Williams, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., Lloyd-Smith, J.O., De Wit, E., Munster, V.J., 2020. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMe2004973>.
- Wang, J., Feng, H., Zhang, S., Ni, Z., Ni, L., Chen, Y., Zhuo, L., Zhong, Z., Qu, T., 2020. SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the Coronavirus Disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. *Int. J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.024>.
- WHO, 2020. *Coronavirus disease (COVID) - Weekly Epidemiological and Operational updates September 2020–2 September 2020*.
- Wu, S., Wang, Y., Jin, X., Tian, J., Liu, J., Mao, Y., 2020. Environmental contamination by SARS-CoV-2 in a designated hospital for coronavirus disease 2019. *Am. J. Infect. Contr.* <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.05.003>.
- Ye, G., Lin, H., Chen, S., Wang, S., Zeng, Z., Wang, W., Zhang, S., Rebmann, T., Li, Y., Pan, Z., Yang, Z., Wang, Y., Wang, F., Qian, Z., Wang, X., 2020. Environmental contamination of SARS-CoV-2 in healthcare premises. *J. Inf. Secur.* <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.034>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.



The morphogenesis of different giant viruses as additional evidence for a common origin of *Nucleocytoviricota*

Rodrigo AL Rodrigues^{1,2}, Fernanda G de Souza¹,
 Bruna L de Azevedo¹, Lorena CF da Silva¹ and
 Joˆnatas S Abrahˆao¹

Large and giant DNA viruses are a monophyletic group constituting the recently established phylum *Nucleocytoviricota*. The virus particle morphogenesis of these viruses exhibit striking similarities. Viral factories are established in the host cells where new virions are assembled by recruiting host membranes, forming an inner lipid layer. An outer protein layer starts as a lamellar structure, commonly referred to as viral crescents, coded by the major capsid protein gene. Also, these viruses have a conserved ATPase-coding gene related to genome encapsidation. Similar properties are described for tectiviruses, putative small ancestors of giant viruses. Here we review the morphogenesis of giant viruses and discuss how the process similarities constitute additional evidence to the common origin of *Nucleocytoviricota*.

Addresses

¹Departament of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

Corresponding author:

Abrahˆao, Joˆnatas S (jonatas.abrahao@gmail.com)

Current Opinion in Virology 2021, 47:102-110

This review comes from a themed issue on Virus structure and expression

Edited by Adolfo Moraes and Flˆvio Fonseca

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.05.004>

1879-6257/ˆa 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The large abundance, diversity, and ubiquity of viruses are some of the virosphere hallmarks. Viruses exhibit different particles, genome sizes and structures, and a broad host range believed to infect all life forms. In contrast to cell-life forms, viruses seem to have had multiple evolutionary origins [1]. In this scenario, some

specific viral groups are proposed to share a common ancestor. The Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses (NCLDV) form a monophyletic viral group comprising large and giant double-stranded DNA eukaryotic viruses [2,3]. Recently, the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classified the recognized NCLDV-composing viral families within a novel phylum named *Nucleocytoviricota* [1]. These viruses can infect a wide diversity of hosts, ranging from algae and amoebas to insects and mammals.

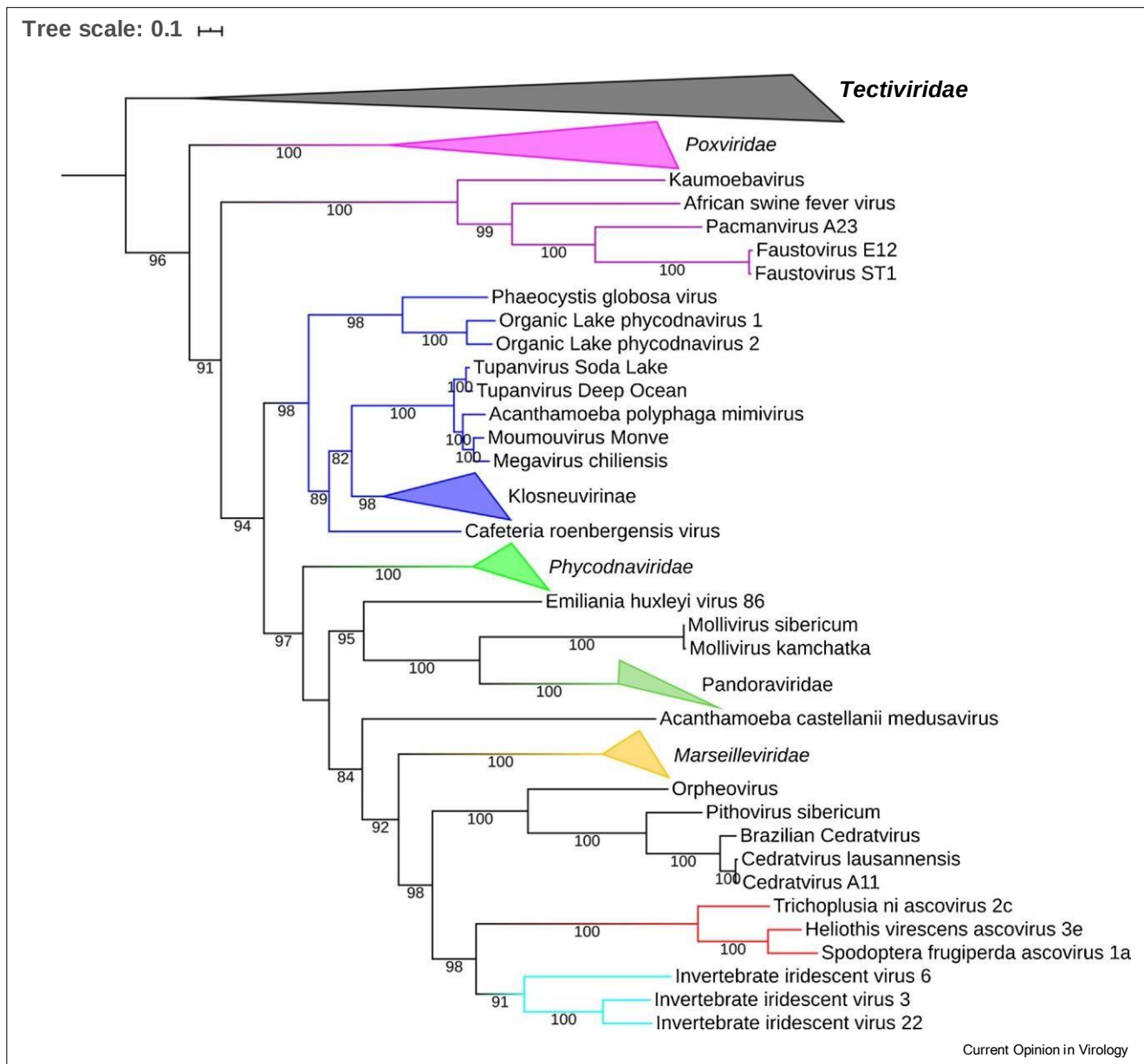
Since the discovery of mimi viruses [4], novel large and giant amoeba viruses have been described and clustered within the NCLDV clade. This continuous group expansion increases the debate about these viruses' origin and evolution [5–11]. A more recent NCLDV origin hypothesis suggests that it can be related to a genome complexification and expansion from smaller ancestor viruses as polintoviruses and *Tectiviridae* bacteriophages [8,9]. The evolutionary origin and relationships of *Nucleocytoviricota* members have been extensively addressed. They can be reconstructed through phylogenetic analysis using a set of conserved genes [9,12], such as the family B DNA polymerase gene, which is mostly used for this purpose and is also present in the *Tectiviridae* ancestors (Figure 1).

These large and giant viruses have many differences, regarding the viral structure and genomic features, possibly resulting from distinct evolutionary histories after divergence from the common ancestor with tectiviruses. Despite this, a common characteristic among *Nucleocytoviricota* members is observed in the viral replication cycle, especially in the morphogenesis step, which occurs in the host cell cytoplasm [2]. Here we cover the main aspects of NCLDV morphogenesis. We will focus on giant amoeba viruses, highlighting the similarities in the assembly process, despite exhibiting different structures and evolutionary histories. Finally, we provide insights into the evolution of the morphogenesis process, considering a small hypothetical common viral ancestor of *Nucleocytoviricota*.

Morphogenesis of large DNA viruses

Unlike most DNA viruses, which have the replication cycle occurring entirely in the host cell nucleus, the NCLDV can complete their entire cycle in the cytoplasm,

Figure 1



Phylogenetic reconstruction using amino acid sequences of the conserved functional gene, DNA polymerase B family, of representative members of phylum *Nucleocyotiviricota* and family *Tectiviridae*. The alignment was built using Muscle with standard parameters [68]. Uninformative positions were removed using TrimAl with gap threshold of 0.2 [69]. Maximum likelihood tree was constructed with IQ-TREE [70]. The best-fitting substitution model selected by IQ-TREE was VT + F + R5. Branch supports were estimated using ultrafast bootstrap (1000 replicates), and the tree was visualized with iTOL [71]. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

or start it in the nucleus (transcription and replication), and ending it in the cytoplasm (morphogenesis) [2]. The NCLDV morphogenesis occurs in dynamic and spatio-temporal coordinated cytoplasmic sites formed with the accumulation of viral and cellular factors, recruitment of membranes, and surrounding mitochondria, the so-called viral factories (VF) [13,14].

Poxviruses morphogenesis consists of a complex process, with the recruitment of viral and cellular proteins [15]. Morphogenesis occurs inside a VF, where viral crescents are formed, which consist of cut regions from the endoplasmic reticulum (ER) membrane, giving rise to open membranes [16–18]. These open membranes are modified and stabilized by the insertion of viral proteins, like

A17 and D13 proteins, among others called ‘viral membrane assembly proteins’ (VMAPs) [16]. Trimers of the D13 scaffold protein associate with the A17, increasing the curvature of the open membranes that expand by fusion with additional membranes and then associate with the nucleoprotein core [19]. The genome acquisition by poxviruses is regulated by a conserved ATPase encoded by the A32L gene, highly conserved among almost all giant viruses [20]. From there, four other successive stages of assembly can be viewed: immature virions (IVs), mature virions (MVs), wrapped virions (WVs), and extracellular virions (EVs) — for a more comprehensive review of this process, please see [15].

The replication cycle of other large DNA viruses has also been investigated, but far less extensively than poxviruses. The asfarviruses morphogenesis also occurs in VF located in the cytoplasm, in the perinuclear area [21–23]. The virus reorganizes the cytoskeleton and the trafficking of endosomal membranes to build the VF, which is also filled with lipid flow mediated by cytoplasmic lipid transfer proteins and ER intermediates [23–25]. In fact, as for poxviruses, it is proposed that the viral inner membrane from ASFV originates from intermediates of that organelle [25]. The asfarviruses assembly occurs through the major capsid protein interaction, p72, with open membrane intermediates forming a large complex viral crescent that culminates in an icosahedral capsid [26,27]. How capsids are filled with DNA, it is not fully established yet, even though a model of simultaneous capsids assembly and DNA insertion has been recently proposed [25].

For the *Iridoviridae* family, the VF remains connected to the nucleus to allow the traffic of cellular factors necessary for viral synthesis [28]. In the VF, viral crescents emerge to start the assembly of double-shell icosahedral capsids with an inner lipid layer, probably derived from the ER. This membrane supports the deposition of the viral capsid that will be filled with DNA. As the process occurs, capsids will curve to form complete icosahedrons, and particles then migrate to the host cells periphery for envelope acquisition [28–30]. Ascoviruses have the least characterized cycle. Morphogenesis occurs in cytoplasmic membranous vesicles. These vesicles are formed after the reorganization and rupture of the nuclear envelope, where the first part of the replication cycle occurs. In these vesicles, the formation of the internal viral complex is covered by a single membrane, and a layer of protein subunits occurs, so it is filled with the nucleoprotein core and genome [31,32].

Finally, the morphogenesis of the eukaryotic algae viruses from family *Phycodnaviridae* also exhibits a concentration of viral and cellular factors in a cytoplasmic VF, however in a slightly different way. These are formed by a network of viral capsid precursors and membrane

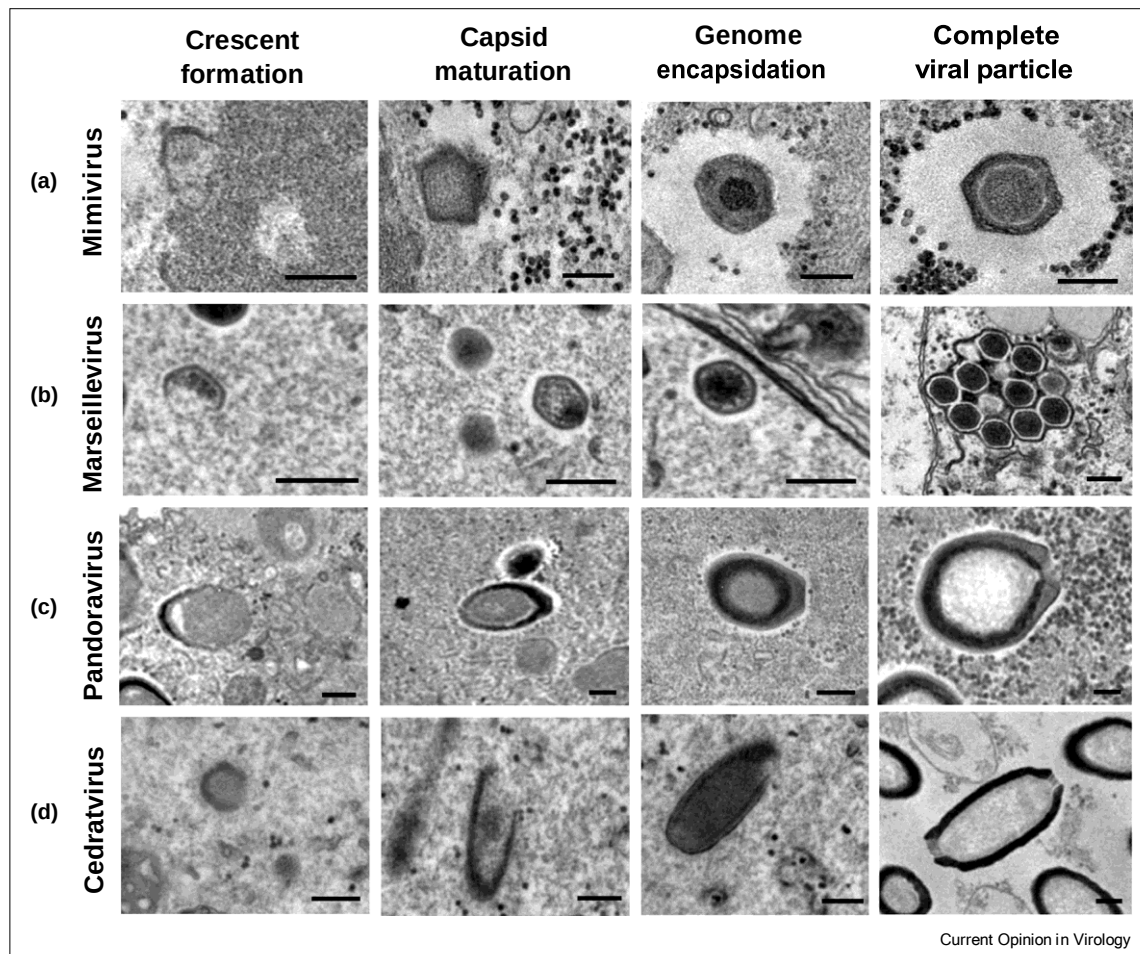
biogenesis in the central region, while the genomes for encapsidation are on the periphery [33]. It is proposed that the viral crescents that give rise to the phycodnaviruses’ inner membrane would also correspond to open membranes derived from the ER. Preformed virions leave the VF and are packed with viral DNA [33]. It is interesting to note that phycodnaviruses’ morphogenesis process has some similarities with other large DNA viruses and the giant amoebae viruses discovered in the past few years, especially with mimiviruses [33].

Giant viruses of amoebae: different structures, similar assembly process

Mimiviruses were the first amoebae viruses to be described, and since then, many different viruses had been isolated and identified by uncultured methods, which expanded the family *Mimiviridae* considerably [34,35]. The interest around these viruses was intense, and many studies were developed to uncover the basic features of the replication cycle of these pseudo-icosahedral viruses. After entry into the host cell and release the genome in the cytoplasm, mimiviruses establish large electron-dense volcano-like VF in the amoeba cytoplasm, in which less electron-dense areas are observed in their periphery, called fibril acquisition area [36,37]. It was proposed that the morphogenesis of mimivirus particles start inside the VF with the formation of lamellar structures, which precede the formation of the capsid. These lamellar structures seem to be analogous to the semicircular structures, that is, the viral crescents, observed in other NCLDV. These structures increase in complexity, and after genome encapsidation and acquisition of fibrils, the particles are complete [37] (Figure 2). It is interesting to note that a very similar process occurs for tupanviruses, despite a significant difference in virion structure — tupanviruses exhibit a long cylindrical tail attached to the capsid [38,39].

Distinct icosahedral large DNA viruses of amoebae have been described over the past years, and their replication cycle also exhibits similarities with other NCLDV. Marseilleviruses establish a large electron-lucent VF in the host cell cytoplasm, presenting intense membrane recruitment in its periphery [40,41]. The replication cycle of Marseilleviruses occurs part in the host nucleus, part in the cytoplasm [42]. It is proposed that the particles’ assembly occurs inside VFs with the formation of crescent-shaped electron-dense structures with the recruitment of endosomes to form the inner membrane found beneath the virus capsid [41]. As the viral crescents increase in complexity and acquire DNA, the complete virions are directed to the cell’s periphery and can be visualized enclosed in membranous vesicles of 300–1000 nm in diameter [41] (Figure 2). The formation of such large vesicles containing hundreds of virions can yield higher infectivity for Marseillevirus, compared to infection by single particles. Other icosahedral amoebae

Figure 2



Main steps of morphogenesis of distinct giant viruses of amoebae. Representative images obtained by transmission electron microscopy were selected to gain a general picture and highlight the similarities in the process of giant viruses with major differences in their structures. (a) *Mimiviridae*, pseudo-icosahedral; (b) *Marseilleviridae*, icosahedral; (c) *Pandoraviridae*, ovoid; (d) *Pithoviridae*, ellipsoid. Images from four sequential steps are indicated in the columns. Scale bars: 250 nm.

viruses have less information about the morphogenesis process. Recent studies demonstrated that Faustovirus also exhibits the formation of crescent-shaped structures during their morphogenesis [43,44]. As these structures gain in complexity and acquire DNA, mature particles are formed and observed in the cell's cytoplasm agglomerated in a honeycomb shape. The formation of viral factories in the host cytoplasm during the morphogenesis step also occurs for kaumobavirus, pacmanvirus, and medusavirus, and the assembly process is similar to other large DNA viruses. However, further in-depth analysis of their replication cycle is required [45–47].

Studies have been carried out over the years, enabling the isolation of several other giant viruses with entirely different structures, with amphora-shaped and ellipsoid capsids, such as pandoravirus, pithovirus, cedratvirus, and orpheovirus

[48–51]. During the replication cycle of these viruses, electron-lucent VF is observed in perinuclear regions. Another common feature observed is the intense recruitment of membranes and mitochondria in peripheral regions of the VF, which was proposed to be necessary for virion inner membrane formation and providing energy for the complete assembly process [52,53,54]. The morphogenesis of cedratviruses begins with the formation of crescent-shaped electron-dense structures inside the VF. Subsequently, these structures undergo longitudinal elongation, assuming a clamp shape. As the particle gains in complexity, they are visualized in a rectangle shape. The capsid walls become thicker, and the genome is encapsidated, leading to complete closure and formation of double-corked mature virions [52] (Figure 2). In previous studies, the same rectangle-shaped structures were described during the morphogenesis of pithoviruses [49], thus constituting

another evidence for a common origin with the cedratviruses, putatively constituting a new viral family *Pithoviridae* with distinct genus, *Pithovirus* and *Cedratvirus*. The morphogenesis of orpheovirus and pandoravirus particles also begins with crescent-shaped structures, but no clip or rectangle-shaped structures occur as observed for *Pithoviridae* members [53,54]. The observed viral crescents become thicker and electron-dense as they increase in size and acquire the internal content until the formation of the mature particles (Figure 2). It is interesting to note that the cellular assembly compartments, for instance, nucleus or cytoplasm, do not appear to interfere directly with the morphology of giant viruses particles. Viruses with completely different morphology (e.g. mimiviruses and pandoraviruses) have their particles assembled in the host's cytoplasm.

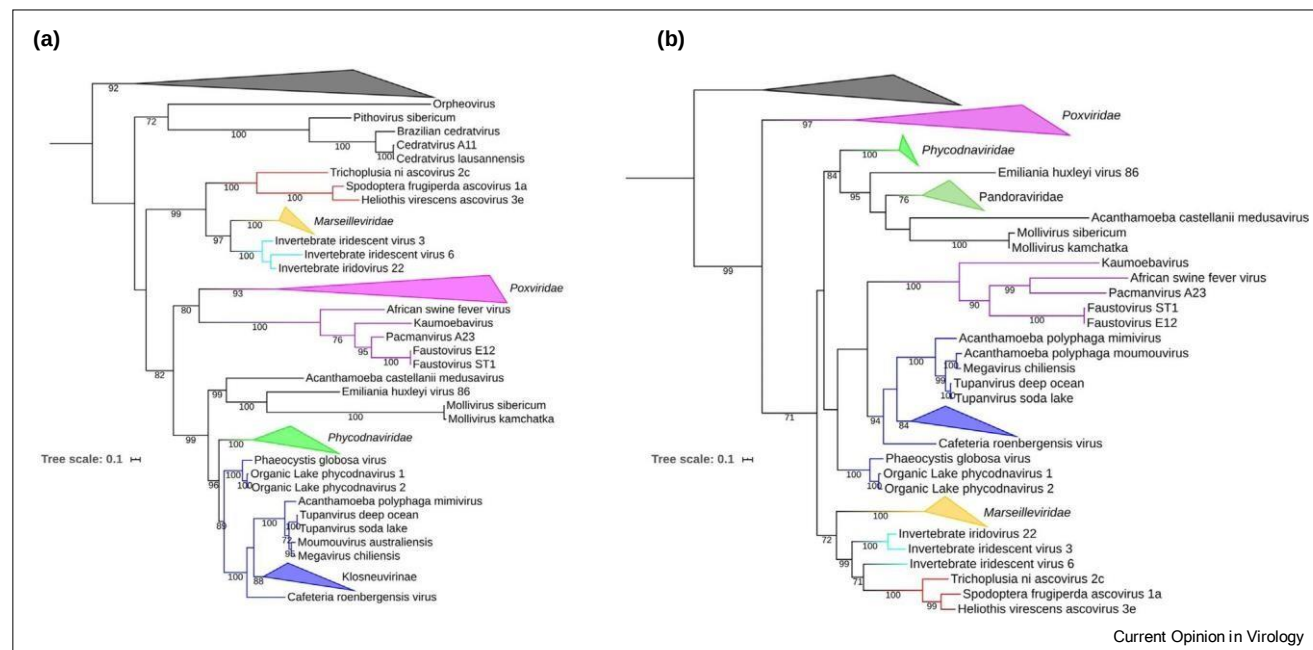
Similar structures described as intermediate membranes or viral crescents are observed during all giant viruses' morphogenesis stages. These structures are also present in the spherical molliviruses, and it was suggested that different viral proteins with transmembrane domains would be involved in the assembly process of mature virions [55,56]. These common features reinforce the common origin of *Nucleocytoviricota*. Those similar characteristics might be conserved since the divergence of the

common ancestor between giant viruses and the smaller tectiviruses.

Evolution of morphogenesis in *Nucleocytoviricota*

The question of the common origin of NCLDV seems to be well established, and recent analyzes have identified a restricted set of genes conserved throughout evolution among different viral groups, with only eight core genes (three universal and five present in most groups) [12]. This same work suggests that NCLDVs originated before the divergence of modern eukaryotes, which corroborates the hypothesis of sharing a common ancestor with smaller viruses that infect prokaryotes. The emergence of giant viruses before the emergence of modern eukaryotes was also conceived using specific translation-related genes of mimiviruses [57]. If we try to reconstruct the evolutionary relationship between these viruses based on a well-preserved functional gene (i.e. DNA polymerase B family), the tectiviruses appear as an external group with high statistical support (Figure 1). A similar topology is observed when using conserved genes that directly participate in the viral morphogenesis process, such as the major capsid protein (MCP) and the DNA packaging ATPase (Figure 3). Given these analyzes, it is plausible that these genes have been preserved throughout

Figure 3



Phylogenetic reconstruction using amino acid sequences of (a) Major Capsid Protein (MCP) and (b) DNA packaging ATPase (A32-like) genes of representative members of phylum *Nucleocytoviricota* and family *Tectiviridae*. The alignments were built using Muscle with standard parameters [68]. Uninformative positions were removed using TrimAl with gap threshold of 0.2 [69]. Maximum likelihood trees were constructed with IQ-TREE [70]. The best-fitting substitution models selected by IQ-TREE were LG + F + R3 (MCP) and LG + F+I + G4 (A32-like). Branch supports were estimated using ultrafast bootstrap (1000 replicates), and the trees were visualized with iTOL [71]. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

evolution as well as the process of morphogenesis itself, where MCP acts as a scaffold protein for the synthesis of new particles and attachment of the internal lipid membrane, a peculiar feature present in both tectiviruses and different viruses of *Nucleocyotiviricota*.

Different genes have been identified as essential for the assembly of new viral particles in poxviruses, the VMAPs, but except the D13L gene (MCP homolog in other giant viruses and tectiviruses), all others are exclusive to poxviruses [16]. It is important to note that D13L is responsible for forming viral crescents in poxviruses, a phenomenon conserved among giant viruses, as we have evidenced here. Interestingly, pandoraviruses do not have a gene homologous to the D13L of poxviruses, but they still show a crescent-shape structure during their morphogenesis (Figure 2). The origin of the pandoraviruses capsid is still a mystery. However, recent studies have addressed this issue and suggested that the viral structure is composed of carbohydrates and that the major constituent of the pandoravirion structure would originate from a glycoside hydrolase present in bacteria [58,59]. Another crucial factor for the accurate assembly of infectious particles of poxviruses is the A32L gene that encodes the DNA packaging ATPase [20]. This gene encodes a protein responsible for encapsidating the viral genome and is conserved in all giant viruses, except for *Pithoviridae* [60]. A homologous protein is also present in tectivirus and is essential in the final stage of morphogenesis [61]. A new class of ATPase will likely be present in pithoviruses, which is substantially different from those analogous to the A32L gene in poxviruses, but whose function is similar. More detailed analyzes looking for ATPases' motifs in the different ORFs of these viruses can help unravel this mystery. Still, it remains unclear

whether other ATPases could play the role of encapsidating the viral genome, such as ATPases of the AAA family, present in orpheovirus, but not in their closest relatives, pithoviruses and cedratviruses [51].

Despite significant similarities, the order of events observed in the morphogenesis of tectiviruses has at least one fundamental difference compared to the giant viruses described so far. Analyzes based on the PDR1 phage's morphogenesis showed that the virus's internal membrane originates from the host's cytoplasmic membrane and then the capsid forms around it [61]. With the giant viruses, however, the order seems to have been reversed. The protein component of the virion is formed initially from viral crescents, which serves as a scaffold for the internal lipid membrane [62,63]. Such differences can be explained by the accumulation of divergences throughout the evolutionary history of these viruses. In any case, viral membrane proteins associate with the host's membranous structures during viral morphogenesis. These proteins could sign an attachment of viral crescents, thus assembling a pre-capsid (outer layer of protein and an inner layer of lipid). Proteins with transmembrane domains are found in abundance in the different groups of giant viruses, ranging from 9.6% of the genes of cedratvirus to around 40% of the genes in *Emiliana huxleyi* virus (Table 1). Transmembrane domain proteins also appear to be in abundance in their putative tectivirus ancestors (e.g. PDR1 has almost 50% of proteins containing such domains). Therefore, the sequential events of morphogenesis of giant viruses may have been conserved throughout evolution, since the divergence of the common ancestor of NCLDV and tectiviruses.

Table 1

Transmembrane domain proteins in large and giant viruses' relatives accessed by TMHMM server 2.0^a

Virus	Taxon (Family)	Genome accession number	Number of proteins	Proteins with TMD ^b (%)
Enterophage PDR1	<i>Tectiviridae</i>	AY848689.1	31	15 (48,4)
<i>Emiliana huxleyi</i> virus 86	<i>Phycodnaviridae</i>	NC_007346.1	472	184 (39)
Iridescent iridovirus 6	<i>Iridoviridae</i>	NC_003038.1	468	133 (28,4)
<i>Paramecium bursaria chlorella</i> virus 1	<i>Phycodnaviridae</i>	NC_000852.5	802	184 (22,9)
<i>Vaccinia</i> virus	<i>Poxviridae</i>	NC_006998.1	223	47 (21,1)
African swine fever virus	<i>Asfarviridae</i>	NC_001659.2	152	31 (20,3)
Faustovirus E12		KJ614390.1	492	87 (17,7)
Pandoravirus dulcis		NC_021858.1	1070	184 (17,2)
Mollivirus sibericum		NC_027867.1	523	89 (17)
Bodo saltans virus	<i>Mimiviridae</i>	MF782455.1	1207	192 (15,9)
<i>Heliothis virescens</i> ascovirus 3e	<i>Ascoviridae</i>	NC_009233.1	180	25 (13,9)
<i>Acanthamoeba castellanii</i> medusavirus		AP018495.1	461	64 (13,9)
Kaumobavirus		NC_034249.1	429	54 (12,6)
Orpheovirus		NC_036594.1	1199	147 (12,3)
Pithovirus sibericum		NC_023423.1	467	56 (12)
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> mimivirus	<i>Mimiviridae</i>	NC_014649.1	979	117 (11,9)
Marseillevirus marseillevirus	<i>Marseilleviridae</i>	NC_013756.1	428	43 (10)
Cedratvirus A11		NC_032108.1	574	55 (9,6)

^a <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.^b Transmembrane domain.

Conclusion and future directions

The origin and evolution of giant viruses is an intriguing mystery that has yet to be adequately unraveled. The same goes for the paths taken during the evolution of the morphogenesis process of these viruses. *Nucleocytoviricota* members exhibit different morphologies and infect a wide range of hosts. A correlation between host preference and morphogenesis seems unlikely, but the structure of these viruses could be correlated to the entry mechanisms exploited by them, thus correlating with host preference during evolution [64,65]. Although very diverse, the different groups of giant viruses show some similarities in assembling their particles that seem to have been preserved throughout evolution. The evidence presented here further reinforces the monophyly of this group and the probable origin from smaller viruses.

Structural biology studies, including reconstructions based on high definition images obtained by techniques such as cryo-EM, are becoming more common, but they are still a significant challenge when applied to giant viruses [66]. Nevertheless, we can expect a considerable advance in this field, and the application of these techniques to giants of the virosphere will provide answers to questions that we can only have a glimpse until now. Finally, viral prospecting and characterization of new viruses must continue to gain novel insights into the origin and evolution of giant viruses, as observed with the recently isolated Yaravirus. It is a new amoeba virus not deeply linked to giant viruses but has similarities in its

replication cycle and even in some genes, such as the presence of a divergent MCP and an A32-like ATPase [67]. These findings will undoubtedly make important

contributions to a better understanding of the evolution of viral morphogenesis.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

We would like to thank all the current and past members of the Grupo de Estudo e Prospecção de Vírus Gigantes (GEPVIG), and also the members of the Laboratório de Vírus of UFMG, which significantly contributed to the development of many studies summarized here. We also thank FAPEMIG, CAPES, and CNPq for financial support. JSA is a CNPq researcher.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- .. of outstanding interest

1. Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M, Varsani A, Wolf YI, Yutin N, Zerbini FM, Kuhn JH: Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. *Microbiol Mol Biol Rev* 2020, 84:e00061-19 <http://dx.doi.org/10.1128/mmlr.00061-19>
- This work is a major effort for a global organization of the viral world, with the most recent proposal of megataxonomy for the virosphere. Common features among different groups of viruses are highlighted to support the

- Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L: Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* 2006, 117:156-184.
3. Iyer LM, Aravind L, Koonin EV: Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J Virol* 2001, 75:11720-11734.
4. 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 (80-)* 2003, 299:2033.
5. 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* 2012, 55:321-332.
6. Colson P, Levasseur A, La Scola B, Sharma V, Nasir A, Pontarotti P, Caetano-Anolles G, Raoult D: Ancestrality and mosaicism of giant viruses supporting the definition of the fourth TRUC of microbes. *Front Microbiol* 2018, 9.
7. Filee J, Pouget N, Chandler M: Phylogenetic evidence for extensive lateral acquisition of cellular genes by Nucleocytoplasmic large DNA viruses. *BMC Evol Biol* 2008, 8:320.
8. Yutin N, Wolf YI, Koonin EV: Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology* 2014, 466-467:38-52.
9. Koonin EV, Krupovic M, Yutin N: Evolution of double-stranded DNA viruses of eukaryotes: from bacteriophages to transposons to giant viruses. *Ann N Y Acad Sci* 2015, 1341:10-24.
10. Nasir A, Caetano-Anolles G: A phylogenomic data-driven exploration of viral origins and evolution. *Sci Adv* 2015, 1: e1500527.
11. Schulz F, Yutin N, Ivanova NN, Ortega DR, Lee TK, Vierheilig J, Daims H, Horn M, Wagner M, Jensen GJ et al.: Giant viruses with an expanded complement of translation system components. *Science (80-)* 2017, 356:82-85.
12. Guglielmini J, Woo A, Krupovic M, Forterre P, Gaia M: Diversification of giant and large eukaryotic dsDNA viruses predated the origin of modern eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, 116:19585-19592

proposal.

Using robust and extensive phylogenetic analyzes, the authors propose that large and giant viruses originated before the emergence of modern eukaryotes and evolved mainly by gene gain and loss.

13. De Castro IF, Volonte' L, Risco C: Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol* 2013, 15:24-34.
14. Mutsafi Y, Fridmann-Sirkis Y, Milrot E, Hevroni L, Minsky A: Infection cycles of large DNA viruses: emerging themes and underlying questions. *Virology* 2014, 466-467:3-14
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.037>.
15. Liu L, Cooper T, Howley PM, Hayball JD: From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses* 2014, 6:3787-3808
<http://dx.doi.org/10.3390/v6103787>.
16. Weisberg AS, Maruri-Avidal L, Bisht H, Hansen BT, Schwartz CL, Fischer ER, Meng X, Xiang Y, Moss B: Enigmatic origin of the poxvirus membrane from the endoplasmic reticulum shown by 3D imaging of vaccinia virus assembly mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114:E11001-E11009
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1716255114>.
17. Husain M, Weisberg AS, Moss B: Existence of an operative pathway from the endoplasmic reticulum to the immature poxvirus membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:19506-19511
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0609406103>.
18. Pathak PK, Peng S, Meng X, Han Y, Zhang B, Zhang F, Xiang Y, Deng J: Structure of a lipid-bound viral membrane assembly protein reveals a modality for enclosing the lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, 115:7028-7032
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1805855115>.
19. Moss B: Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 2006, 344:48-54
<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.037>.

20. Cassetti MC, Merchlinsky M, Wolffe EJ, Weisberg AS, Moss B: DNA packaging mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *J Virol* 1998, 72:5769-5780 <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.7.5769-5780.1998>.
21. Rojo G, Garcí'a-Beato R, Viní uela E, Salas ML, Salas J: Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology* 1999, 257:524-536 <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1999.9704>.
22. Simões M, Freitas FB, Leitão A, Martins C, Ferreira F: African swine fever virus replication events and cell nucleus: new insights and perspectives. *Virus Res* 2019, 270:197667 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197667>.
23. Cuesta-Geijo MA, Barrado-Gil L, Galindo I, Muñoz-Moreno R, Alonso C: Redistribution of endosomal membranes to the African swine fever virus replication site. *Viruses* 2017, 9:133 <http://dx.doi.org/10.3390/v9060133>.
24. Netherton CL, Wileman TE: African swine fever virus organelle rearrangements. *Virus Res* 2013, 171:76-86 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.014>.
25. Suarez C, Andres G, Kolovou A, Hoppe S, Salas ML, Walther P, Krijnse Locker J: African swine fever virus assembles a single membrane derived from rupture of the endoplasmic reticulum. *Cell Microbiol* 2015, 17:1683-1698 <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12468>.
26. Hawes PC, Netherton CL, Wileman TE, Monaghan P: The envelope of intracellular African swine fever virus is composed of a single lipid bilayer. *J Virol* 2008, 82:7905-7912 <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00194-08>.
27. Brookes SM, Hyatt AD, Wise T, Parkhouse RME: Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during african swine fever virus particle assembly: ultrastructural in situ hybridization and DNase-gold labelling. *Virology* 1998, 249:175-188 <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9308>.
28. Liu Y, Tran BN, Wang F, Ounjai P, Wu J, Hew CL: Visualization of assembly intermediates and budding vacuoles of Singapore grouper iridovirus in grouper embryonic cells. *Sci Rep* 2016, 6:18696 <http://dx.doi.org/10.1038/srep18696>.
29. Wang F, Bi X, Chen LM, Hew CL: ORF018R, a highly abundant virion protein from Singapore grouper iridovirus, is involved in serine/threonine phosphorylation and virion assembly. *J Gen Virol* 2008, 85:1169-1178 <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.83639-0>.
30. Ma J, Zeng L, Zhou Y, Jiang N, Zhang H, Fan Y, Meng Y, Xu J: Ultrastructural morphogenesis of an amphibian iridovirus isolated from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *J Comp Pathol* 2014, 150:325-331 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.007>.
31. Tan Y, Spears T, Bideshi DK, Johnson JJ, Hice R, Bigot Y, Federici BA: P64, a novel major virion DNA-binding protein potentially involved in condensing the *Spodoptera frugiperda* Ascovirus 1a genome. *J Virol* 2009, 83:2708-2714 <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01610-08>.
32. Asgari S, Bideshi DK, Bigot Y, Federici BA, Cheng XW: ICTV virus taxonomy profile: Ascoviridae. *J Gen Virol* 2017, 98:4-5 <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000677>.
33. Milrot E, Mutsafi Y, Fridmann-Sirkis Y, Shimon E, Rechav K, Gurnon JR, Van Etten JL, Minsky A: Virus-host interactions: insights from the replication cycle of the large *Paramecium bursaria* chlorella virus. *Cell Microbiol* 2016, 18:3-16.
34. La Scola B: Looking at protists as a source of pathogenic viruses. *Microb Pathog* 2014, 77:131-135.
35. Schulz F, Roux S, Paez-Espino D, Jungbluth S, Walsh DA, Denev VJ, McMahon KD, Konstantinidis KT, Elie-Fadrosh EA, Kyrpides NC et al.: Giant virus diversity and host interactions through global metagenomics. *Nature* 2020, 578:432-436 <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-1957-x>.
36. Suzan-Monti M, La Scola B, Barrassi L, Espinosa L, Raoult D: ..
37. Dos Santos Pereira Andrade AC, Rodrigues RAL, Oliveira GP, Andrade KR, Bonjardim CA, La Scola B, Kroon EG, Abrahão JS: Filling knowledge gaps for mimivirus entry, uncoating, and morphogenesis. *J Virol* 2017, 91:e01335-17.
38. Abrahão J, Silva L, Silva LS, Khalil JYB, Rodrigues R, Arantes T, Assis F, Boratto P, Andrade M, Kroon EG et al.: Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. *Nat Commun* 2018, 9:749

Description of the isolation and characterization of complex giant viruses having the most complete translational apparatus described in the virosphere. Tupanviruses belong to the family *Mimiviridae* and can replicate in different host cells, differently from other giant viruses described so far.

39. Silva LCF, Rodrigues RAL, Oliveira GP, Dornas FP, Scola B La, Kroon EG, Abrahão JS: Microscopic analysis of the tupanvirus cycle in *vermamoeba vermiformis*. *Front Microbiol* 2019 <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00671>.
40. Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, Robert C, Azza S, Sun S, Rossmann MG et al.: Giant *Marseillevirus* highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:21848-21853.
41. Arantes TS, Rodrigues RAL, dos Santos Silva LK, Oliveira GP, de Souza HL, Khalil JYB, de Oliveira DB, Torres AA, da Silva LL, Colson P et al.: The large marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. *J Virol* 2016, 90:5246-5255.
42. Fabre E, Jeudy S, Legendre M, Trauchessec M, Claverie J, Abergel C: Noumeavirus replication relies on a transient remote control of the host nucleus. *Nat Commun* 2017, 8:15087.
43. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, Andreani J, Armstrong N, Klose T, Rossmann M, Colson P, Raoult D, La Scola B: Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J Virol* 2015, 89:6585-6594.

44. Borges I, Rodrigues RAL, Dornas FP, Almeida G, Aquino I, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS: Trapping the enemy: *Vermamoeba vermiformis* circumvents Faustovirus marseillevirus dissemination by enclosing viral progeny inside cysts. *J Virol* 2019, 93
- ..

Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus

Description of the replication cycle of faustoviruses, and evidences of a new antiviral strategy is presented. The authors demonstrate that infected amoeba cells can enclose viral progeny inside cysts and prevent viral dissemination.

45. Bajrai LH, Benamar S, Azhar EI, Robert C, Levasseur A, Raoult D, La Scola B: Kaumobavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses* 2016, 8.
46. Andreani J, Khalil JYB, Sevvana M, Benamar S, Di Pinto F, Bitam I, Colson P, Klose T, Rossmann MG, Raoult D *et al.*: Pacmanvirus, a new giant icosahedral virus at the crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. *J Virol* 2017, 91:e00212-17.
47. Yoshikawa G, Blanc-Mathieu R, Song C, Kayama Y, Mochizuki T, Murata K, Ogata H, Takemura M: Medusavirus, a novel large DNA virus discovered from hot spring water. *J Virol* 2019, 93.
48. Philippe N, Legendre M, Doutre G, Coute' Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C *et al.*: Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science (80-)* 2013, 341:281-286.
49. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, Lescot M, Poirot O, Bertaux L, Bruley C *et al.*: Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:201320670.
50. Andreani J, Aherfi S, Khalil JYB, Di Pinto F, Bitam I, Raoult D, Colson P, La Scola B: Cedratvirus, a double-cork structured giant virus, is a distant relative of pithoviruses. *Viruses* 2016, 8:1-11.
51. Andreani J, Khalil JYB, Baptiste E, Hasni I, Michelle C, Raoult D, Levasseur A, La Scola B: Orpheovirus IHUMI-LCC2: a new virus among the giant viruses. *Front Microbiol* 2018, 8:1-11.
52. Silva LKDS, Andrade ACDSP, Dornas FP, Rodrigues RAL, Arantes T, Kroon EG, Bonjardim CA, Abrahao' JS: Cedratvirus

getuliensis replication cycle: an in-depth morphological analysis. *Sci Rep* 2018, 8

The in-depth description of the replication cycle of cedratviruses. The authors demonstrate the sequential events of morphogenesis of this group of viruses, and similarities in the process with other giant viruses are discussed.

53. Dos Santos Pereira Andrade AC, de Miranda Boratto PV, Rodrigues RAL, Bastos TM, Azevedo BL, Dornas FP, Oliveira DB, Drumond BP, Kroon EG, Abrahão JS: New isolates of pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. *J Virol* 2018, 93:e01942-18 <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01942-18>

New pandoraviruses are isolated and used to better investigate the replication cycle of these amphora-shaped viruses. Insights are provided around how the giant virions are assembled in large viral factories in the host cytoplasm.

54. Souza F, Rodrigues R, Reis E, Lima M, La Scola B, Abrahão J: In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus. *Virol J* 2019, 16:1-11.
55. Legendre M, Lartigue A, Bertaux L, Jeudy S, Bartoli J, Lescot M, Alempic JM, Ramus C, Bruley C, Labadie K et al.: In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-yold giant virus infecting Acanthamoeba. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112:E5327-E5335 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1510795112>.
56. Quemin ER, Corroyer-Dumont S, Baskaran A, Penard E, Gazi AD, Christo-Foroux E, Walther P, Abergel C, Krijnse-Locker J: Complex membrane remodeling during virion assembly of the 30,000-year-old Mollivirus sibericum. *J Virol* 2019, 93:e00388-19 <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00388-19>

66.

The replication cycle with an emphasis on the morphogenesis of mollivirus is described. Authors use different microscopic and computational analyzes to reconstruct the assembly process of this apparently rare giant virus.

57. Marcelino VM, Espinola MVPC, Serrano-Solis V, Farias ST: Evolution of the genus Mimivirus based on translation protein homology and its implication in the tree of life. *Genet Mol Res* 2017, 16:gmr16039784 <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039784>.
58. Brahim Belhaouari D, Baudoin JP, Gnankou F, Di Pinto F, Colson P, Aherfi S, La Scola B: Evidence of a cellulosic layer in Pandoravirus massiliensis tegument and the mystery of the genetic support of its biosynthesis. *Front Microbiol* 2019, 10:2932 <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02932>.
59. Krupovic M, Yutin N, Koonin E: Evolution of a major virion protein of the giant pandoraviruses from an inactivated bacterial glycoside hydrolase. *Virus Evol* 2020, 6:veaa059 <http://dx.doi.org/10.1093/ve/veaa059>.
60. Koonin EV, Yutin N: Evolution of the large nucleocytoplasmic DNA viruses of eukaryotes and convergent origins of viral gigantism. *Advances in Virus Research*. 2019

A recent and comprehensive review of the origin and evolution of large and giant DNA viruses. The authors suggest the origin of NCLDV from small viruses and the convergence for viral gigantism.

61. Hong C, Oksanen HM, Liu X, Jakana J, Bamford DH, Chiu W: A Structural model of the genome packaging process in a membrane-containing double stranded DNA virus. *PLoS Biol* 2014, 12:e1002024 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002024>.
62. Suares C, Welsch S, Chlanda P, Hagen W, Hoppe S, Kolovou A, Pagnier I, Raoult D, Krijnse Locker J: Open membranes are the precursors for assembly of large DNA viruses. *Cell Microbiol* 2013, 15:1883-1895 <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12156>.
63. Mutsaers Y, Shimon E, Shimon A, Minsky A: Membrane assembly during the infection cycle of the giant Mimivirus. *PLoS Pathog* 2013, 9:e1003367 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003367>.
64. Rodrigues RAL, Abrahão JS, Drumond BP, Kroon EG: Giant among larges: how gigantism impacts giant virus entry into amoebae. *Curr Opin Microbiol* 2016, 33:88-93 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.009>.
65. de Souza GAP, Queiroz VF, Coelho LFL, Abrahão JS: Alohomo! What the entry mechanisms tell us about the evolution and diversification of giant viruses and their hosts. *Curr Opin Virol* 2021, 47:79-85 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2021.02.003>. Okamoto K, Miyazaki N, Song C, Maia FRNC, Reddy HKN, Abergel C, Claverie JM, Hajdu J, Svenda M, Murata K: Structural variability and complexity of the giant *Pithovirus sibericum* particle revealed by high-voltage electron cryo-tomography and energy-filtered electron cryo-microscopy. *Sci Rep* 2017, 7:1-12.
67. Boratto PVM, Oliveira GP, Machado TB, Andrade ACSP, Baudoin JP, Klose T, Schulz F, Azza S, Decloquement P, Chabrière E et al.: Yaravirus: a novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020, 117:16579-16586.
68. Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004, 32:1792-1797.
69. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T: trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 2009, 25:1972-1973 <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.
70. Nguyen L, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ: IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2014, 32:268-274.
71. Letunic I, Bork P: Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019, 47:W256-W259 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz239>.

ANEXO III. Outras atividades desenvolvidas durante o doutorado

1. Atividades relacionadas ao enfrentamento da pandemia da COVID-19

- 1.1 Atuação junto a equipe de diagnóstico de SarsCoV-2 no Laboratório de vírus do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG;
- 1.2 Atuação em projeto de validação de aparelho purificador de ar para eliminação de SarsCoV-2 no ambiente sob coordenação do Professor Dr. Alexandre Leão do Instituto de Belas Artes da UFMG e parceria com Centro de Microscopia da UFMG;
- 1.3 Atuação em pesquisa de detecção de SarsCoV-2 em ambiente hospitalar sob demanda do Ministério Público de Minas Gerais;
- 1.4 Atuação em pesquisa de detecção de SarsCoV-2 em amostras ambientais em parceria com a prefeitura de Juatuba e CDTN-UFMG.

2. Participação em eventos científicos

- 2.1 XXIX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY XIII MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY . 2018.
- 2.2 XXX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY XIV MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY . 2019
- 2.3 V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas. 2018.