

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO VÍRUS GIGANTE DE
AMEBAS: *Golden mussel marseillevirus***

RAÍSSA NUNES DOS SANTOS

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Ana Cláudia Franco

Porto Alegre

Fevereiro/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO VÍRUS GIGANTE DE
AMEBAS: *Golden mussel marseillevirus***

Raíssa Nunes dos Santos

Bacharel em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Ambiental

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Ana Cláudia Franco

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Fevereiro/2016

Nunes dos Santos, Raissa
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO VÍRUS
GIGANTE DE AMEBAS: Golden mussel marseillevirus /
Raissa Nunes dos Santos. -- 2016.
67 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. vírus gigantes. 2. marseillevirus. 3. mexilhão-
dourado. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa
suficiente para nossa busca contínua”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por mais estes dois anos de suporte, tanto financeiro quanto emocional. Por me apoiar mesmo nos dias mais difíceis e principalmente por sempre se interessar pelo meu trabalho. É muito gratificante.

Agradeço aos meus amigos, que mesmo distantes mantiveram-se comigo. Que estiveram sempre prontos para comemorar a cada passo que avancei. Obrigada por todo o carinho que tiveram comigo e por entender quando eu não pude sair naquele sábado à noite... E obrigada também por sempre estarem dispostos a ouvir minhas histórias um tanto quanto estranhas e microbiológicas fazendo eu me sentir especial.

O meu profundo agradecimento aos professores que caminharam comigo nesta nova etapa na UFRGS e em especial à minha orientadora por toda atenção e paciência, inclusive pelo trabalho em plenas férias na praia.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas do Laboratório de Virologia que tornaram o ambiente de trabalho prazeroso e divertido, sem perder a seriedade e em especial ao Dr. Fabrício Campos, por todos os ensinamentos e árduo trabalho nesta descoberta.

De maneira geral gostaria de agradecer ao universo que rege à vida na Terra por trazer tantas coisas boas nestes anos.

E finalmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e aos órgãos de fomento FINEP, FAPERGS E CNPq.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO VÍRUS GIGANTE DE AMEBAS: *Golden mussel marseillevirus*¹

Autor: Raíssa Nunes dos Santos

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Ana Cláudia Franco

RESUMO

Marseilleviridae é uma família de vírus gigantes cujos membros infectam amebas de vida livre. Esses vírus têm sido encontrados em amostras ambientais de água, larvas de inseto, torres de resfriamento e mais recentemente em amostras humanas. Eles possuem capsídeo icosaédrico medindo entre 190-250 nm e genoma de DNA dupla fita circular ou linear. Sua replicação ocorre no citoplasma amebiano onde observam-se fábricas virais. Este trabalho tem como objetivo investigar a presença de vírus gigantes em mexilhões-dourados (*Limnoperna fortunei*) que habitam o Lago Guaíba, Porto Alegre, Brasil. Quarenta indivíduos foram coletados e agrupados em *pools* de 5 amostras (água interna e corpo, totalizando dezesseis *pools*). Os *pools* foram homogeneizados em tampão fosfato, centrifugados e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45µM. Foram cultivadas amebas da espécie *Acanthamoeba polyphaga* em meio PYG em microplacas de 24 poços, inoculadas com os sobrenadantes, incubadas a 30°C e examinadas diariamente em busca de efeito citopático (ECP) até 72 horas após a inoculação. Quando CPE era evidente, os sobrenadantes foram coletados e ultracentrifugados através de um gradiente de sacarose de 25%. Um dos dezesseis *pools* induzindo CPE claro foi submetido à extração de DNA e sequenciamento do genoma viral completo um sequenciador de nova geração (Illumina MiSeq). O genoma do vírus chamado *Golden mussel marseillevirus* consiste de uma única molécula de DNA de 360610 pb, com um teor de G+C de 43,1%. A análise da sequência de nucleotídeos traduzida revelou a presença de proteínas virais que apresentam homologia com proteínas de outros membros da família *Marseilleviridae*, como *Lausanevirus* e vírus *Insectomime*, porém grande parte do seu genoma não apresenta identidade com proteínas depositadas no banco de dados. A análise filogenética do gene D6/D11 Helicase sugere que este vírus faça parte de uma nova linhagem de marseillevirus. Este é o primeiro estudo que demonstra o isolamento de um vírus gigante a partir de tecidos de mexilhão-dourado e infere que estes vírus estão distribuídos amplamente no meio ambiente.

Palavras-chave: Vírus gigantes. Marseillevirus. Illumina. *Limnoperna fortunei*

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69 p.) fevereiro, 2015.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW GIANT VIRUS IN

AMOEBAE: *Golden mussel marseillevirus*¹

Author: Raíssa Nunes dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

Marseilleviridae is a family of giant viruses whose members infect free living amoebae. These viruses have been found in environmental samples of water, insect larvae, cooling towers and, more recently, in human samples. They have icosahedral capsids measuring between 190-250 nm and their genome is double-stranded circular or linear DNA. Replication occurs in the host cell cytoplasm, inside the viral factories. This study aims to investigate the presence of giant viruses in tissues of golden mussels (*Limnoperna fortunei*) that inhabit the Guaíba Lake, Porto Alegre, Brazil. Forty specimens were pooled in groups of 5 specimens (internal water and body, totalizing sixteen pools). The pools were homogenized with phosphate buffer, centrifuged and the supernatant was filtered in 0,45µM. Monolayers of *Acanthamoeba polyphaga* were cultivated with PYG medium in 24-well microplates, inoculated with the pooled samples, incubated at 30 °C and examined daily in search for cytopathic effect (CPE) up to 72 hours after inoculation. When CPE was evident, the supernatants were collected, clarified and ultra centrifuged through a 25% sucrose cushion. One out of the sixteen CPE positive pools was submitted to DNA extraction and complete sequencing of the viral genome in a NGS apparatus (Illumina MiSeq). The genome of the virus named *Golden mussel marseillevirus* consists of a single DNA molecule of 360,610 bp, with a G+C content of 43.1%. The analysis of the translated nucleotide sequence reveals the presence of proteins which are homologs to proteins predicted in other members of the family *Marseilleviridae* like, e.g. *Lausannevirus* and *Isectomime* virus. However, part of the viral genome has no identity with the nucleotide sequences available at the database. The phylogenetic analysis of the *D6/D11 Helicase* gene suggests that this virus is part of a new lineage of marseillevirus. This is the first study where the isolation of a giant virus from golden mussel tissues is achieved, suggesting that these viruses are widely distributed in the environment.

Keywords: Giant virus. Marseillevirus. Illumina. *Limnoperna fortunei*.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

(69 p.) february, 2015.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 <i>Mimiviridae</i> : a primeira família de vírus gigantes	5
3.2 Família <i>Marseilleviridae</i>	7
3.2.1 <i>Marseillevirus</i> : distribuição geográfica	9
3.3 Relações filogenéticas entre os vírus gigantes.....	10
3.4 Amebas de Vida Livre (AVL)	11
3.5 Bivalves filtradores: mexilhões-dourado	12
3.6 Sequenciamento de genomas	14
3.6.1 <i>História</i>	14
3.6.2 <i>Sequenciamento de nova geração (NGS): Illumina</i>	14
3.6.3 <i>Montagem das reads geradas no NGS</i>	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Área de estudo e coletas	17

4.2	Preparação das amostras.....	18
4.3	Isolamento viral	19
4.4	Visualização do vírus por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	19
4.5	Titulação viral e curva de crescimento	20
4.6	Caracterização molecular do vírus	21
4.6.1	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real</i>	21
4.6.2	<i>Extração de DNA viral purificado</i>	21
4.6.3	<i>Sequenciamento completo e anotação do genoma viral</i>	21
4.6.4	<i>Montagem e determinação da topologia viral</i>	22
4.6.5	<i>Confirmação da topologia do genoma</i>	22
5.	RESULTADOS.....	24
5.1	Isolamento viral	24
5.2	MET.....	24
5.3	Curva de crescimento "One Step"	25
5.4	Qualidade e quantidade do DNA a ser submetido para NGS.....	26
5.5	PCR em tempo real para confirmação da família	27
5.6	Sequenciamento completo do genoma viral.....	27
5.7	Anotação do genoma	28

5.8	Determinação da topologia do genoma viral	28
6.	DISCUSSÃO	31
7.	CONCLUSÃO	33
8.	REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mimivirus. Capsídeo icosaédrico de 400 nm de diâmetro. Fibrilas com até 125 nm de comprimento. Capsídeo contém o núcleo interno cercado por uma camada interna de lipídios	7
Figura 2 -	Ciclo de vida do Mimivirus em <i>Acanthamoeba castellanii</i> . Ao centro uma representação esquemática e imagens de microscopia eletrônica de transmissão ilustrando as principais etapas do ciclo infeccioso. Os hexágonos vermelhos representam as partículas virais, a forma oval azul representa as fábricas de vírus, o núcleo celular é o círculo cinza e o vacúolo como círculo branco.	9
Figura 3 -	Partícula viral com diâmetro de aproximadamente 250 nm.	11
Figura 4 -	A expansão da família <i>Marseilleviridae</i>	13
Figura 5 -	Relações filogenéticas entre os NCDLVs, tamanho do genoma e tamanho dos virions	14
Figura 6 -	Em formato estrelado dois cistos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . Aumento: 400x	16
Figura 7 -	Rota de entrada do mexilhão-dourado na América do Sul	18
Figura 8 -	Esquema do funcionamento da plataforma Illumina	20
Figura 9 -	Foto do sequenciador Illumina MiSeq	21
Figura 10 -	Mexilhão-dourado após abertura da concha para coleta de água e tecidos.	24
Figura 11	Mapa de localização do ponto de coleta em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	25
Figura 12	Fluxograma de processamento das amostras de mexilhões-dourados. Apenas os tecidos foram macerados. A (AI) foi coletada separadamente e um microtubo de 1,5mL	26
Figura 13	Disposição dos poços para titulação de cada um dos pontos em quadruplicata (vertical)	28
Figura 14	Coloração de Gram. Esquerda: amebas não infectadas. Direita: Amebas infectas mostrando as possíveis fabricas virais no citoplasma (FV). Aumento: 1000x	33
Figura 15	Características do CPE. Esquerda: amebas não infectadas. Direita: C (Grupos em cadeia), AC (arredondamento celular), D (debris). Aumento 100x	34
Figura 16a	Partícula viral em MET de contraste positivo. Crédito: UnB.	34

Figura 16b	Partículas virais dentro do citoplasma amebiano em MET de contraste negativo	35
Figura 17	Gráfico da curva de crescimento viral. Eixo y= logTCID50. Eixo x= tempo, medido em horas	36
Figura 18	Gel de agarose, 1,5%. Corrida a 80V por 45 minutos. M= marcador: λ clivado com HindIII. C=- Amostra negativa. DNA= Extração de DNA do isolado, amostra enviada para NGS	36
Figura 19	Construção filogenética baseada no alinhamento do gene D6/D11 Helicase construída no software MEGA 6 (http://www.megasoftware.net/) pelo método de neighbor-joining. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> moumovirus foi usado para criação da raiz	30 38
Figura 20	Distribuição dos alinhamentos	39
Figura 21	<i>Golden marseillevirus</i> x <i>Lausannevirus</i>	40
Figura 22	<i>Golden marseillevirus</i> x <i>Marseillevirus marseillevirus</i>	40
Figura 23	<i>Golden marseillevirus</i> x <i>Insectomime virus</i>	40
Figura 24	Alinhamento gerado pelo Mauve das sequências geradas por 3 algoritmos diferentes	41
Figura 25	Gel de agarose 1,5%. M= marcador de 100bp. G= reação com oligonucleotídeos Geneious; A= ABBYS, S=Spades	41
Figura 26	Tela gerada pelo programa Geneious mostrando uma possível ORF entre as posições final e inicial	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APMV	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>
AVLs	Amebas de Vida Livre
CA	Ceratite amebiana
CDS	Coding DNA Sequence
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA dupla fita
ECP	Efeito citopagênico
EGA	Encefalite granulomatosa amebiana
GalNac	N- acetil galactosamina
GlcACc	N-acetil glicosamina
kb	Kilobases
m.o.i	Multiplicity of infection
mb	Megabases
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mL	Mililitros
NCLDV	Grandes vírus de DNA núcleo citoplasmático
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanômetros
ORFs	Região aberta de leitura
p.i	Pós infecção
Pb	Pares de bases

PBS	Phosphate buffer saline
PYG	Peptona-Extrato de levedura-Glicose
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
TEN	Tris-EDTA-NaCl
µg	Microgramas
µM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

Os vírus gigantes, caracterizados por apresentarem diâmetro de até 0,8 µm e conterem um genoma constituído de DNA de dupla fita entre 1,2 e 2,5 mb, estão amplamente distribuídos em amostras de origem ambiental (BULGHAMI *et al.*, 2013). A existência desses vírus foi observada somente recentemente, pois as técnicas usualmente aplicadas à identificação viral como purificação e concentração da amostra, que incluem membranas que retêm partículas maiores do que 300 nm, não são aplicáveis ao isolamento de vírus gigantes, pois estes exibem um tamanho superior (Colson, *et al.*, 2012). A partir do desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de análise desses vírus, eles vêm sendo isolados mais frequentemente a partir de amostras de água, rios, lagos, mares e solos (Bulghami, *et al.*, 2013).

Os vírus do gênero *Mimivirus* foram os primeiros vírus gigantes identificados (La Scola, 2003). Eles contêm genoma composto de DNA dupla fita linear e infectam múltiplas espécies do gênero *Acanthamoeba*. Esse vírus foi primeiramente isolado de uma torre de resfriamento de um hospital na Inglaterra em 1992, após um surto de pneumonia em humanos (CLAVERIE, *et al.*, 2009). Por ser uma partícula que pode ser observada em microscopia ótica, o vírus foi confundido por vários anos com uma bactéria, mas em 2003, foi comprovada a origem viral desse agente. O primeiro mimivírus foi identificado com 0,7 µm de diâmetro e um genoma de 1,2 mb codificando mais de 100 proteínas, algumas das quais ainda sem identidade conhecida (Claverie, *et al.*, 2011). Esse vírus foi nomeado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* e sua descoberta e a análise do seu genoma completo impressionou a

comunidade de virologistas e evolucionistas (Claverie, *et al.* 2006). O tamanho físico dos mimivírus é comparado ao de uma pequena bactéria, e desta constatação derivou seu nome: “mimi”, referente à mimetização do tamanho e forma de algumas bactérias (Raoult, 2007). Inicialmente o mimivírus foi associado a casos de pneumonia humana, já que este foi identificado em meio a um surto da doença (Raoult, *et al.* 2004) e devido à demonstração de que as partículas do vírus são fagocitadas e replicam-se em macrófagos humanos (Ghigo, *et al.*, 2008). Esta associação com patologias ainda não está elucidada.

Em 2007, foi descoberto outro gênero de vírus gigantes, isolado de uma torre de resfriamento na França. Esse gênero foi denominado *Marseillevirus* e, os estudos atuais já identificaram outros membros deste gênero, constituindo uma nova família de vírus gigantes: *Marseilleviridae*. O genoma dos vírus desta família tem aproximadamente 350 000 pb e seu capsídeo mede em torno de 200nm. Assim como mimivírus, os marseillevírus também infectam diferentes espécies de *Acanthamoeba*. O seu ciclo replicativo é rápido, sendo finalizado entre 16 h e 24 h (VIRALZONE, 2015). Atualmente foram isolados marseillevirus de diferentes amostras ambientais como fontes de água, larvas de inseto e fezes humanas e seu genoma foi encontrado em doadores de sangue assintomáticos (Aherfi, S., *et al.*, 2014).

Encontradas em água doce, solo úmido, esgoto e ar, as amebas de vida livre (AVL) são protozoários cujo gênero *Acanthamoeba* será referência neste estudo (AMATO NETO, V. 2008). Esse gênero de AVLS também já foi encontrado em piscinas (CAUMO, *et al.*, 2009), água mineral engarrafada (LORENZO MORALES, *et al.*, 2005), soluções de limpeza para lentes de contato (PENS, *et al.* 2008) e

umidificadores de ar (FORONDA, 1996). Nos humanos estes protozoários são isolados a partir das vias áreas superiores, do ouvido e até do sistema nervoso central (KODET, *et al.*, 1998). Diante desta ampla distribuição, estima-se que 80% dos indivíduos saudáveis apresentem anticorpos contra *Acanthamoeba* (IOVIENO, *et al.* 2010).

No Rio Grande do Sul está presente um bivalve, da família *Mytilidae* que é comumente conhecido como mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*), o qual foi objeto deste estudo (DARRIGRAN, 2000). O *L. fortunei* ocorre no Lago Guaíba e é originário do sudoeste asiático. Estudos mostram que esta espécie foi introduzida no sul do Brasil como parte da água de lastro dos navios cargueiros. É um organismo conhecido pelo seu potencial bioacumulador, já que filtra água para obter nutrientes, acumulando no interior da sua concha diversos compostos químicos e micro-organismos. A espécie já está bem difundida na Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba devido a algumas características reprodutivas como apresentar uma fase larval e, à grande resistência, na fase adulta, à poluição e a baixos níveis de oxigênio (TERRA, N. R. *et al.*, 2007).

A interação das AVLs com outros micro-organismos como bactérias e fungos é bastante conhecida (BARBOLT *et al.*, 2012; KUIPER *et al.*, 2006; 2012; HEINNING *et al.*, 2007; GREUB *et al.*, 2004), no entanto a relação destes protozoários com vírus é pouco conhecida. Considerando que águas superficiais são ambientes em que AVLs são encontradas em abundância, assim como diferentes espécies de bivalves bioacumuladores, essa proposta foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a presença de vírus gigantes em amostras de *L. fortunei* coletadas no

município de Porto Alegre. A identificação desses vírus a partir das amostras de mexilhões possibilitará o conhecimento sobre a distribuição desses vírus em outros locais do mundo e sobre novas alternativas e estratégias de isolamento destes vírus a partir de organismos bioacumuladores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolamento e caracterização de vírus gigantes a partir de amostras de mexilhões-dourados (de *L. fortunei*).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Isolar vírus gigantes de amostras de água interna e de tecidos de mexilhões dourados coletados no Lago Guaíba, Porto Alegre, RS, Brasil;

2.2.2 Caracterizar o efeito citopático dos vírus em *Acanthamoeba*;

2.2.3 Caracterizar morfológicamente as partículas virais por microscopia eletrônica de transmissão;

2.2.4 Sequenciar o genoma completo do vírus e caracterizar regiões genômicas, e regiões abertas de leitura (ORFs)

2.2.5 Realizar uma análise comparativa do genoma obtido com genomas de vírus gigantes já conhecidos

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Mimiviridae*: a primeira família de vírus gigantes

Em 1992, durante um surto de pneumonia em humanos, um micro-organismo que crescia em amebas e era similar a uma coco gram-positiva foi isolado de uma torre de resfriamento em Bradford, Inglaterra. Vários protocolos de extração e ampliações por reação em cadeia da polimerase, incluindo a amplificação do 16S rRNA, não conseguiram identificar o micro-organismo isolado. Estudos utilizando microscopia eletrônica mostraram morfologia característica de vírus, com partículas de 400 nm de diâmetro e capsídeo icosaédrico. Não foi observado envelope viral, porém anexadas ao capsídeo observaram-se fibrilas de 80 nm (Figura 1). Como o vírus também se assemelha, ou “mimetiza” uma bactéria na coloração de Gram, foi nomeado *Mimivirus* (La Scola, B., *et al.*, 2003). Este vírus, não filtrável através das membranas de 0,2 µm comumente utilizadas para isolamento de partículas virais, também se tornou o primeiro vírus a apresentar partículas individuais claramente visíveis sob um microscópio de luz comum (Claverie, J. M. and C. Abergel, 2010). Esse vírus foi classificado na nova família *Mimiviridae*, ordem *Megavirales*. A sua descoberta despertou discussões sobre evolução e origem, bem como a diferenciação entre vírus e organismos vivos (Campos, R. K., *et al.*, 2014).

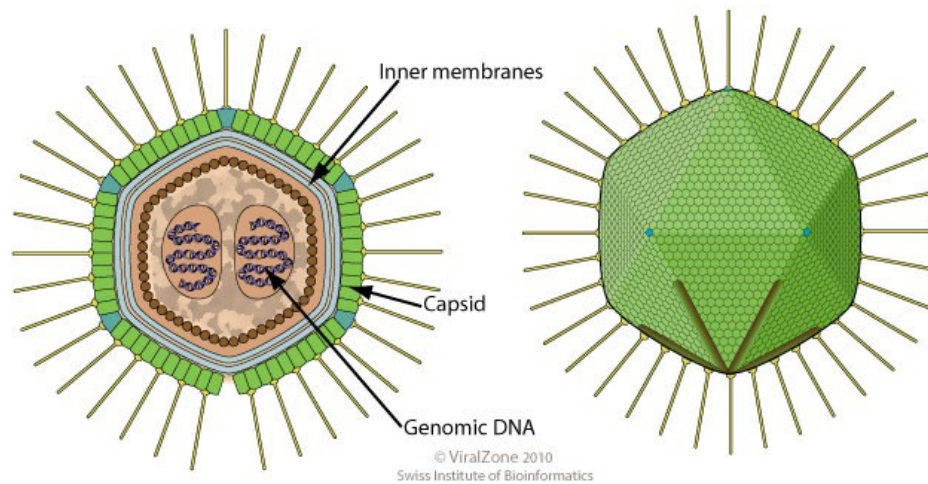


Figura 1- Estrutura da partícula de *Mimivirus*. Capsídeo icosaédrico de 400 nm de diâmetro. Fibrilas com até 125 nm de comprimento. Capsídeo contém o núcleo interno cercado por uma camada interna de lipídios (Fonte: ViralZone, 2010).

O genoma do APMV consiste em uma dupla fita de DNA com aproximadamente 1,2 Mb que codificam aproximadamente 1000 proteínas, muitas delas ainda não caracterizadas ou com funções nunca observadas antes em outros vírus. Quatro grupos de regiões abertas de leitura (ORFs) foram identificados no seu genoma: (i) genes “core” dos *Megavirales*, (ii) genes envolvidos na transferência lateral de informação genética, (iii) genes duplicados e (iv) ORFans. Esses últimos recebem esse nome porque são sequências que exibem baixa ou nenhuma homologia com sequências nucleotídicas depositadas nos bancos de dados atuais (Abrahão, J. S., *et al.*, 2014). Boa parte dos genes virais codificam proteínas que estão envolvidas na tradução, síntese e reparo do DNA, motilidade celular e biogênese da membrana. Muitas dessas provavelmente não são essenciais para a replicação viral, mas possivelmente conferem alguma vantagem evolutiva ao vírus.

Os mimivírus se replicam em AVLS do gênero *Acanthamoeba*, que podem ser parte da microbiota normal de alguns animais incluindo humanos (Abrahao, J. S.,

et al., 2014). O vírus entra na ameba pelo processo de fagocitose. Após a entrada é envolvido por uma membrana que se funde ao lisossomo. O capsídeo em forma de estrela (*star gate*) abre-se e ocorre a fusão da membrana viral com a membrana lisossômica. O genoma é liberado no citoplasma da ameba e inicia-se uma fábrica viral (que contém a maioria dos elementos necessários para montagem das estruturas). Após algumas horas a fábrica viral cresce e organiza a morfogênese e por fim dá origem a progênie que é liberada por lise celular. A figura 2 ilustra este ciclo replicativo.

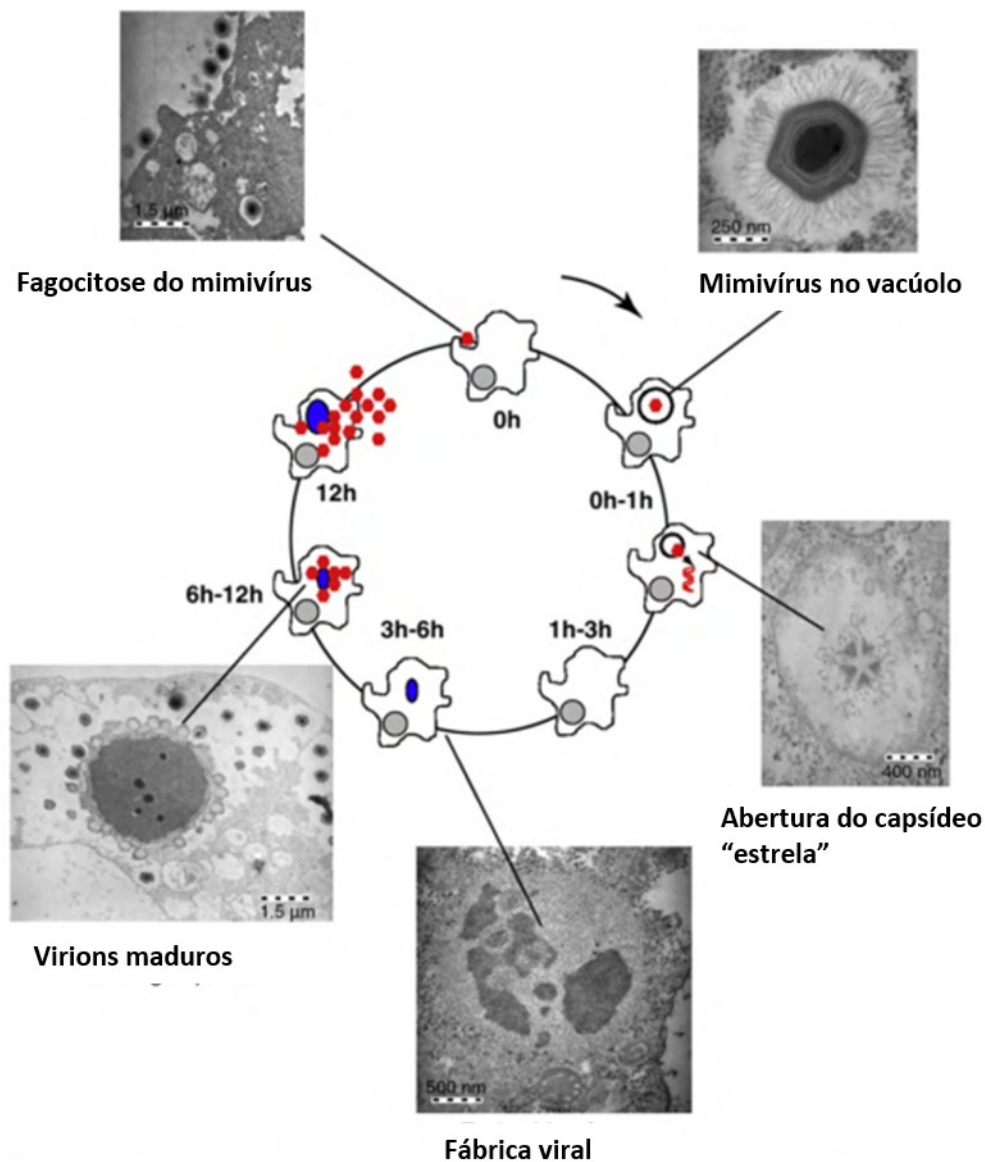


Figura 2- Ciclo de vida do *Mimivirus* em *A. castellanii*. Ao centro uma representação esquemática e imagens de microscopia eletrônica de transmissão ilustrando as principais etapas do ciclo infeccioso. Os hexágonos vermelhos representam as partículas virais, a forma oval azul representa as fábricas de vírus, o núcleo celular é o círculo cinza e o vacúolo como círculo branco. (Fonte: Adaptado de Claverie, J. M. and C. Abergel, 2010)

3.2 Família *Marseilleviridae*

O *Marseillevirus* foi isolado em 2007 de amostras de uma torre de resfriamento em Paris, em co-cultivo com *Acanthamoeba polyphaga*. Este vírus possui um capsídeo de aproximadamente 250 nm de diâmetro, conforme podemos

observar na figura 3. Desde o isolamento deste primeiro marseillevírus em Paris (2009), a família *Marseilleviridae* tem se expandido rapidamente. Cinco membros tiveram seu genoma completo sequenciado e foram distribuídos em 3 linhagens. A linhagem A compreende o *Marseillevirus* e o *Cannes 8*, a linhagem B inclui o *Insectomime* vírus e o *Tunisvirus* e a linhagem C compreende apenas um membro, o *Lausannevirus* (Doutre, G., et al., 2014).

O genoma dos marseillevirus consiste em molécula dupla fita de DNA circular (linear apenas em *Lausannevirus*) com aproximadamente 368 Kb, com conteúdo de guanina e citosina em torno de 44%. O genoma de *Marseillevirus* codifica 457 proteínas com tamanho variando de 50 a 1537 aminoácidos. Quarenta e um por cento dos seus genes preditos têm homologia com outros genes disponíveis nos bancos de dados, sendo 51 genes originados de outros NLCDVs, 49 genes de origem bacteriana ou de bacteriófagos e, mais recentemente, foram descritos 85 genes de origem eucariótica, adquiridos do seu hospedeiro, *Acanthamoeba spp.*

A replicação, expressão e morfogênese do vírions ocorrem nas grandes fábricas virais, que foram observadas em células infectadas com outros vírus gigantes. Estas fábricas de vírus são observadas perto do núcleo da ameba e a montagem do capsídeo e incorporação do DNA ocorrem simultaneamente. O vírus entra na célula por fagocitose, após a fusão do envelope viral com a membrana celular, induzindo a liberação do DNA viral no citoplasma amebiano. O núcleo celular encolhe, indicando uma possível indução de degradação dos cromossomos do hospedeiro. Há a síntese de algumas proteínas e replicação do DNA genômico. A montagem é feita nas fabricas virais e a liberação dos virions ocorre após a lise

celular. O esquema de replicação é análogo ao demonstrado na figura 2. O ciclo replicativo é completo entre 16-24h, e observa-se significantes alterações na morfologia das amebas após 30 minutos de infecção (SIW, ViralZone, 2014).

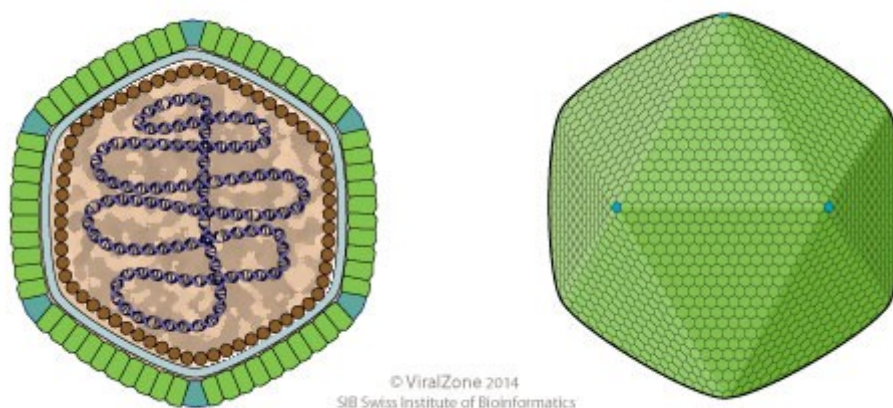


Figura 3- *Marseillevirus* com diâmetro de aproximadamente 250 nm. (FONTE: ViralZone, 2014)

3.2.1 *Marseillevirus*: distribuição geográfica

Os membros da família *Marseilleviridae* foram identificados em amostras de três países, como demonstrado na Figura 4. O primeiro membro da família *Marseilleviridae*, como já mencionado, foi isolado em 2007 em uma torre de resfriamento em Paris. O segundo marseillevírus a ser descrito foi o *Lausannevirus*, isolado em 2011 a partir de uma amostra do Rio Sena, próximo a Paris. As partículas deste vírus foram inicialmente confundidas com cocos positivos, e posteriormente foi demonstrada morfologia icosaédrica, com diâmetro de 190-220 nm. Não foi observada a presença de fibrilas ao redor do seu capsídeo (Thomas, V., *et al.*, 2011).

Em 2013, foi isolado um outro membro da família, denominado Cannes8 virus, isolado de uma torre de resfriamento no sudoeste da França (Aherfi, S., *et al.*, 2013). No mesmo ano foram isolados o *Tunisvirus* e o *Fontaine Saint-Charles virus*, a partir de amostras de fontes decorativas na cidade de Tunis em Ariana, subúrbio da Tunísia e na cidade de Marseille, na França, respectivamente (Aherfi, S., *et al.*, 2014). As características morfológicas destes vírus são similares aos outros marseillevirus previamente descritos. O vírus *Insectomime* foi isolado dos órgãos internos e trato digestivo de uma larva da díptera *Eristalis tenax*, um inseto polinizador. Estas larvas foram coletadas de dois reservatórios de água na Tunísia (Boughalmi, M., *et al.*, 2013). O *Senegalvirus* foi descoberto durante um estudo sobre a diversidade bacteriana da microbiota intestinal humana de um africano saudável. Este estudo gerou muitas sequências sem identidade bacteriana que inicialmente foram descartados, mas que, ao serem reavaliados, apresentaram identidade com o genoma de *Marseillevirus*. A figura abaixo apresenta a distribuição geográfica dos marseillevirus até 2014.

Recentemente um novo marseillevirus foi descoberto em Calanque na França a partir de uma amostra de água salobra que fluiu em um submarino. A anotação deste novo genoma mostrou a predição de 410 proteínas, com mais de 90% destas exibindo homologia com a família *Marseilleviridae*. Este vírus apresentou identidade com *Lausannevirus*, diferindo no gene da Helicase entre as posições 4212 to 7452 que apresenta identidade com *Insectomime* (Doutre, 2015)

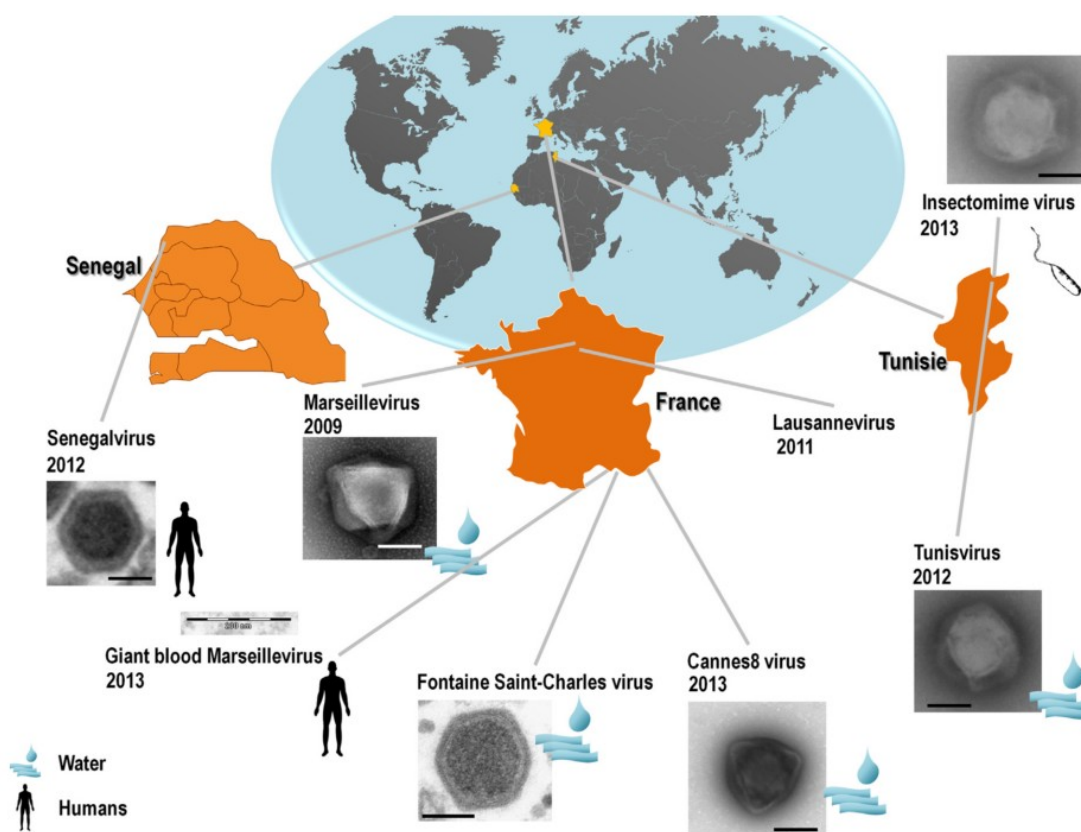


Figura 4- A expansão da família *Marseilleviridae* (Fonte: Aherfi, S., et al., 2014)

3.3 Relações filogenéticas entre os vírus gigantes

O sistema de Baltimore classifica os vírus de acordo com o seu tipo de genoma e estratégia de replicação. Portanto, nesta classificação, os vírus gigantes se enquadram no Grupo I, junto a os outros vírus de genoma DNA dupla fita (dsDNA). De acordo com seu tamanho e suas características biológicas, estes vírus pertencem ao grupo de vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA (NCLDVs) ao lado dos poxvírus e iridovírus. Enquanto os vírus dsDNA parecem não ter uma origem evolutiva em comum, os NCLDVs contêm cinco genes “core” e parecem compartilhar um conjunto de cerca de 50 genes com ancestrais comuns (Katzourakis, A. and A. Aswad, 2014). No entanto, há níveis baixos de similaridade genética entre os

NCLDV, o que dificulta o posicionamento filogenético dos mesmos. As relações entre as famílias deste grupo de vírus podem ser construídas com base no uso de múltiplos genes conservados. A relação filogenética dos genes da DNA polimerase, por exemplo, revela que os pandoravírus (isolados na Costa do Chile, medindo cerca de 1000 nm e com genoma codificando aproximadamente 2500 ORFs) estão mais relacionados com o *Emiliana huxleyi virus* que infecta a espécie (que deu origem ao seu nome) de cocolitóforo (alga marinha unicelular) (Schroeder, C. D., et al., 2002). A árvore filogenética dos NCLDVs pode ser visualizada na figura 5 (Katzourakis, A. and A. Aswad, 2014).

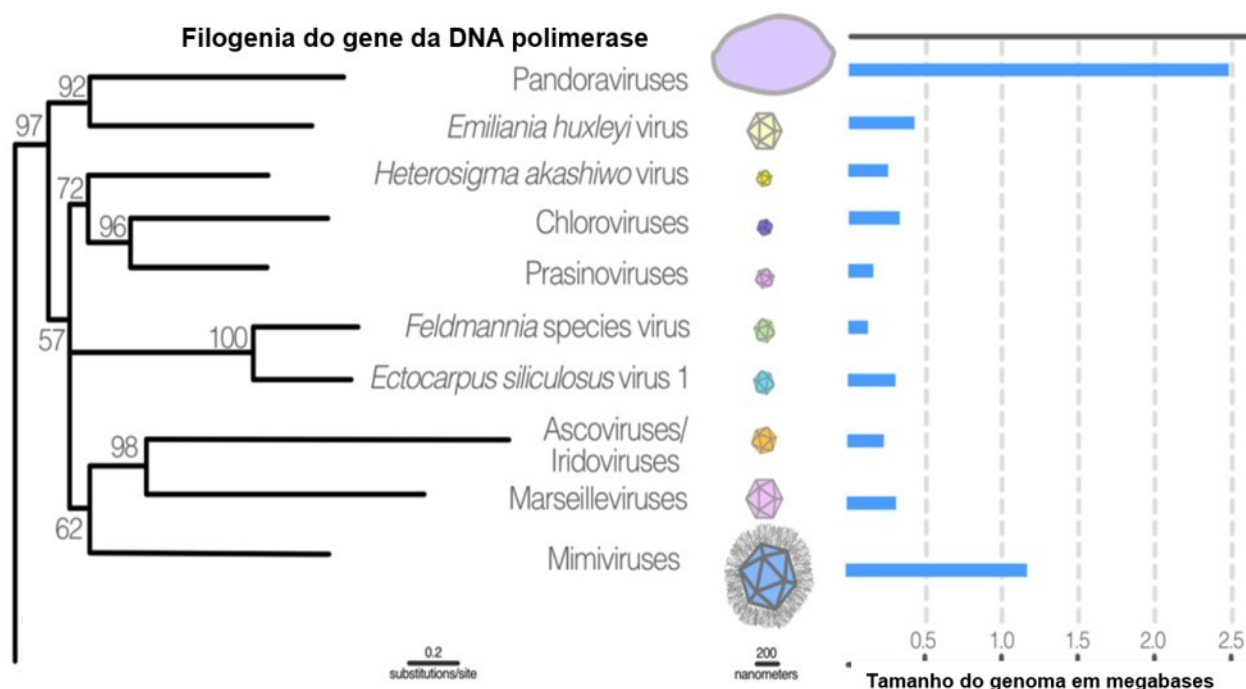


Figura 5- Relações filogenéticas entre os NCLDVs, tamanho do genoma e tamanho dos virions. (Fonte: Adaptado de Katzourakis, A. and A. Aswad, 2014)

3.4 Amebas de vida livre (AVL)

As amebas de vida livre (AVLs) são protozoários ubiquamente distribuídos em locais úmidos, água, solos e ar. Estes protistas apresentam-se sob duas formas:

trofozoítos (metabolicamente ativa) e cistos (forma de resistência a condições desfavoráveis do meio ambiente, resistindo ao congelamento, dessecação e numerosos agentes antimicrobianos (OBEID, W. *et al.*, 2003). As duas formas podem ser observadas na figura 6.

Estes protozoários, quando na fase trofozoíto se alimentam por fagocitose. Através deste mecanismo as amebas podem incorporar diversos micro-organismos, tais como bactérias, fungos, vírus e até mesmo outros protozoários. Em condições ambientais favoráveis os protistas se multiplicam através do processo de divisão celular.

Os membros dos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Naegleria* são AVLs mas podem ser responsáveis por casos de infecção humana, sendo alguns fatais. As espécies de *Acanthamoeba* estão relacionadas a casos de encefalite granulomatosa amebiana (EGA), e quadros clínicos diversos como a ceratite amebiana (CA), que são lesões ulceradas na córnea (Cholewinski, M., *et al.*, 2015). Tanto a *Naegleria* quanto a *Acanthamoeba* podem ser cultivadas em laboratório facilmente. O meio sintético para crescimento destes protozoários é o PYG (pH=6,5), composto de peptona, extrato de levedura, glicose e sais.

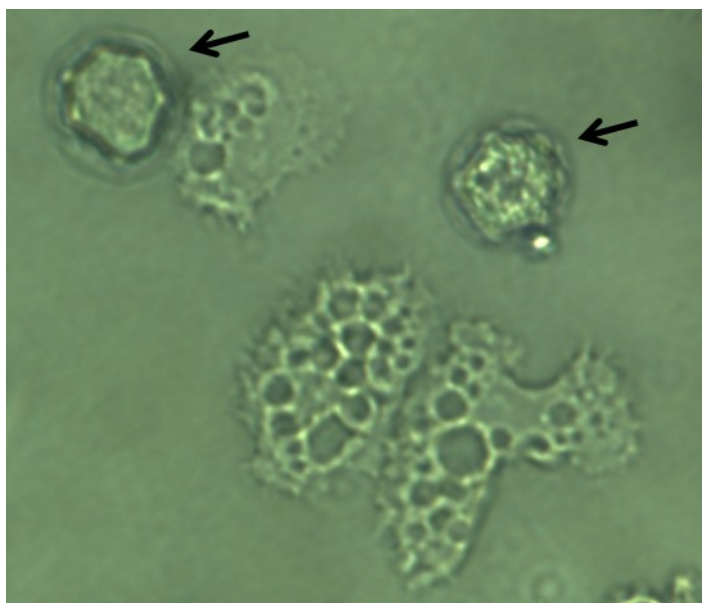


Figura 6- Em formato estrelado dois cistos apontados pelas setas de *Acanthamoeba polyphaga*. Aumento: 400x. (Fonte: Do autor, 2015)

Os vírus gigantes são capazes de infectar AVLs. Um estudo demonstrou que as fibrilas dos mimivírus, que contêm uma densa camada de glicoproteínas, são necessárias para adesão do vírus nas AVLs. Na superfície da *Acanthamoeba* já foram identificados glicose, manose, N-acetil galactosamina (GalNAc) e N-acetil glicosamina (GlcACc), carboidratos que servem como unidades fundamentais para o arranjo de vários polímeros naturais como peptidoglicano e quitina, ambos distribuídos amplamente no universo microbiano. Recentemente foi demonstrado que resíduos de GalNAc interagem com as fibrilas de mimivírus nos estágios iniciais da entrada do vírus nas células (Rodrigues, R. A., et al., 2015).

3.5 Bivalves filtradores: mexilhões-dourado

No final da década de 90, foi registrada no Rio Grande do Sul a ocorrência do mexilhão-dourado. O *Limnoperna fortunei*, descrito por Dunker em 1857 é um bivalve da família *Mytilidae* originário do sudoeste asiático e trazido à Bacia Hidrográfica do

Lago Guaíba pela água dos lastros de navios cargueiros. Esses eram originados da Ásia e descarregavam seus produtos na bacia do Rio de La Plata (Argentina) (Simeão *et al.*, 2006). A figura 7 ilustra a entrada da espécie na América do Sul. O bivalve se espalhou rapidamente pela bacia do Rio de La Plata bem como nas bacias dos Lagos Guaíba e Tramadaí (Brasil), Lagoa Patos-Mirim (Brasil-Uruguai) e mar Chiquita (Argentina). Estas colonizações menores foram provavelmente devidas à ação antrópica nos mananciais. A espécie não possui predadores naturais e apresenta características que favorecem a sua rápida proliferação no ambiente aquático (Terra, N.R. *et al.*, 2007).

Atualmente o molusco está disseminado em cinco países da América do Sul, além dos que já foram citados, incluindo a Bolívia e o Paraguai. A expansão se deu numa velocidade muito rápida (250 km/ano), como por exemplo no Rio Paraná (Oliveira, M. D., *et al.*, 2015). Este molusco é um potencial bioacumulador e a espécie é muito resistente a diversas formas de poluição e a níveis de oxigênio baixos. A espécie é filtradora, dióica e apresenta fertilização externa. As larvas possuem tamanho de 200-300 μm (Boltovskoy & Cataldo, 2000), sendo planctônicas. A maturidade é atingida com aproximadamente 30 dias de vida e 5 mm de comprimento (Colares *et al.*, 2002; Filippo, 2004).



Figura 7- Rota de entrada do mexilhão-dourado na América do Sul. (Fonte: disponível em <http://tedconfblog.files.wordpress.com/2014/09/mapa.png?w=900>)

3.6 Sequenciamento de genomas

3.6.1 História

A identificação das sequências nucleotídicas completas dos genomas de organismos ou micro-organismos é importante para a análise de diferentes propriedades biológicas destes, como interações com o meio ambiente e outros organismos e relações evolutivas. Os primeiros trabalhos de sequenciamento foram feitos em uma única sequência de RNA curta em 1964, por Holley e colaboradores. Esses determinaram a primeira sequência de RNA de transferência da alanina, com menos de 100 nucleotídeos. Já em 1972 Fiers e colaboradores determinaram a sequência do gene da proteína de revestimento do bacteriófago MS2 e, 4 anos depois, o genoma completo (RNA) deste mesmo bacteriófago. O primeiro genoma de

DNA sequenciado foi o genoma do bacteriófago ϕ X174, com 5368 nucleotídeos (Sanger, 1977). Depois deste sequenciamento, Sanger desenvolveu o método de “*shot gun*” que foi aplicado a diferentes genomas. O genoma humano, com 3 bilhões de nucleotídeos foi sequenciado somente em 2003, após 13 anos de trabalho (Chin F.Y.L, *et al.*, 2014).

A determinação da sequência do genoma de um organismo pode ser dividida em duas etapas principais: sequenciamento e montagem. Na primeira etapa ocorre o sequenciamento randômico de fragmentos da amostra, chamados de *reads* de uma sequência de DNA ou RNA. Já a montagem é o passo que analisa o conjunto de fragmentos amostrados de locais desconhecidos e determina a sequência original, na ordem correta (Chin F.Y.L, *et al.*, 2014).

3.6.2 Sequenciamento de nova geração: *Illumina*

Assim como o sequenciamento de Sanger, o sequenciamento de nova geração é feito com base no processo de síntese de DNA, usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos (Carvalho & Silva, 2010). A novidade deste sistema consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo denominado como PCR em fase sólida. Esta superfície de clonagem (*flow cells*) é dividida em linhas, e em cada uma das linhas são fixados adaptadores pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte de hibridização. Os fragmentos de DNA da amostra também se ligam aos adaptadores nas duas extremidades (5' e 3'), o que permite sua fixação ao suporte por hibridização a um dos adaptadores. No primeiro ciclo, os nucleotídeos não

marcados são fornecidos, para que ocorra a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado. No ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura tipo “ponte” e ocorre a extensão, formando uma fita complementar, que também é do tipo “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Os ciclos são repetidos 35 vezes e aproximadamente 1000 cópias geradas de cada fragmento nesta etapa da PCR sólida são geradas e permanecem próximas, formando um cluster de sequenciamento. Um esquema deste processo de sequenciamento pode ser observado na figura 8, já uma imagem do sequenciador pode ser visualizada na figura 9.

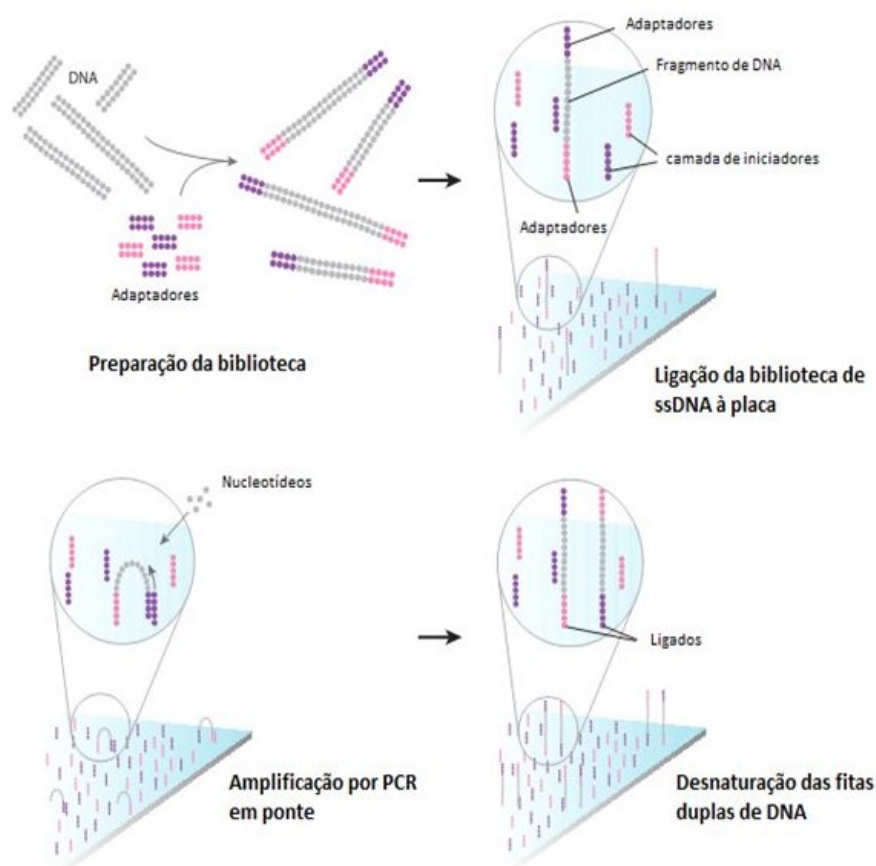


Figura 8- Funcionamento da plataforma Illumina. O DNA é fragmentado e aleatoriamente ligado a adaptadores tanto na extremidade 5' quanto na 3'. As moléculas de fita simples de DNA aderem por afinidade ao suporte sólido onde também estão aderidos oligonucleotídeos complementares em alta densidade. A estrutura tipo “ponte” é formada durante a etapa de anelamento, no primeiro ciclo da amplificação por PCR em fase sólida. Uma vez fornecidos os reagentes necessários a PCR é iniciada

utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer (anelamento) e na etapa da desnaturação a “ponte” é desfeita mediante elevação da temperatura. Repete-se o anelamento e forma-se novas estruturas tipo ponte, iniciando um novo ciclo de amplificação. Com incorporação de nucleotídeos marcados e excitação a laser é gerado o sinal que é capturado e interpretado pelo dispositivo de leitura com um dos quatro possíveis nucleotídeos que compõe a cadeia. (Fonte: Carvalho & Silva, 2010).



Figura 9. Foto do sequenciador Illumina MiSeq. (Fonte: Illumina®)

3.6.3 Montagem das reads geradas no sequenciamento de nova geração

A posição de cada leitura da sequência de DNA ou RNA no genoma é desconhecida e faz-se necessário o processo de combinação dessas *reads* em uma sequência original. Grande parte do número de sequências é amostrado de forma aleatória ao longo da sequência e as informações sobrepostas das sequências são usadas para a montagem. As abordagens para montagem destas leituras podem ser de três tipos: sobreposição e extensão, gráfico da sequência e gráfico de Brujin. Os montadores atualmente utilizados na maioria dos trabalhos utilizam a abordagem de Brujin. A abordagem de Brujin, utilizada nos *softwares* Velvet, Abyss e métodos de

Euler, constrói um gráfico para as leituras em que cada vértice representa uma subsequência de caracteres de comprimento k (k -mer) e na *read* há uma direção da borda do vértice “u” ao vértice “v” que são “ k -mers” consecutivos numa *read*, ou seja $k-1$ do k -mer. Esta abordagem oferece algumas vantagens em relação às outras, como por exemplo, a utilização de menos memória, já que o armazenamento é independente do número de leituras. Como resultado, o gráfico de Brujin é amplamente utilizado para montagem de *reads* do NGS.

3.6.3 Montagem das *reads* geradas no NGS

A posição de cada leitura da sequência de DNA ou RNA no genoma é desconhecida e faz-se necessário o processo de combinação dessas *reads* em uma sequência original. Grande parte do número de *reads* é amostrado de forma aleatória ao longo da sequência, as informações sobrepostas das *reads* são usadas para a montagem. As abordagens para montagem destas leituras podem ser de três tipos: sobreposição e extensão, gráfico da sequência e gráfico de Brujin. Os montadores atualmente utilizados na maioria dos trabalhos utilizam a abordagem de Brujin. A abordagem de Brujin, utilizada nos *softwares* Velvet, Abyss e métodos de Euler, constrói um gráfico para as leituras em que cada vértice representa uma subsequência de caracteres de comprimento k (k -mer) e na *read* há uma direção da borda do vértice “u” ao vértice “v” que são “ k -mers” consecutivos numa *read*, ou seja $k-1$ do k -mer. Esta abordagem oferece algumas vantagens em relação às outras, como por exemplo a utilização de menos memória, já que o armazenamento é

independente do número de leituras. Como resultado, o gráfico de Brujin é amplamente utilizado para montagem de *reads* do NGS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coletas

Mexilhões-dourados, pertencentes à espécie *L. fortunei* foram coletados no Lago Guaíba, Porto Alegre Rio Grande do Sul (30° 2' 2.57" S, 51° 14' 28.04" W). Os animais encontravam-se a uma profundidade de 3M, fixados a uma grade submersa há aproximadamente 6 meses, em um ponto de acesso restrito à margem do lago. A coleta destes animais ocorreu no período de junho de 2014, com auxílio do centro de Ecologia da UFRGS (Instituto de Biociências no Departamento de Ecologia). Aproximadamente 100 animais foram transportados sob refrigeração ao Laboratório de Virologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS.

Os bivalves foram descontaminados externamente com etanol 70% e utilizou-se instrumentos estéreis como bisturis, tesouras e micropipetadores para realizar a coleta dos seus órgãos internos e água interna. A figura 10 mostra alguns mexilhões já abertos antes da coleta da água e tecidos para isolamento. O local de coleta é mostrado no mapa a seguir (Figura 11).



Figura 10- Mexilhão-dourado após abertura da concha para coleta de água e tecidos. (FONTE: Arquivo pessoal)

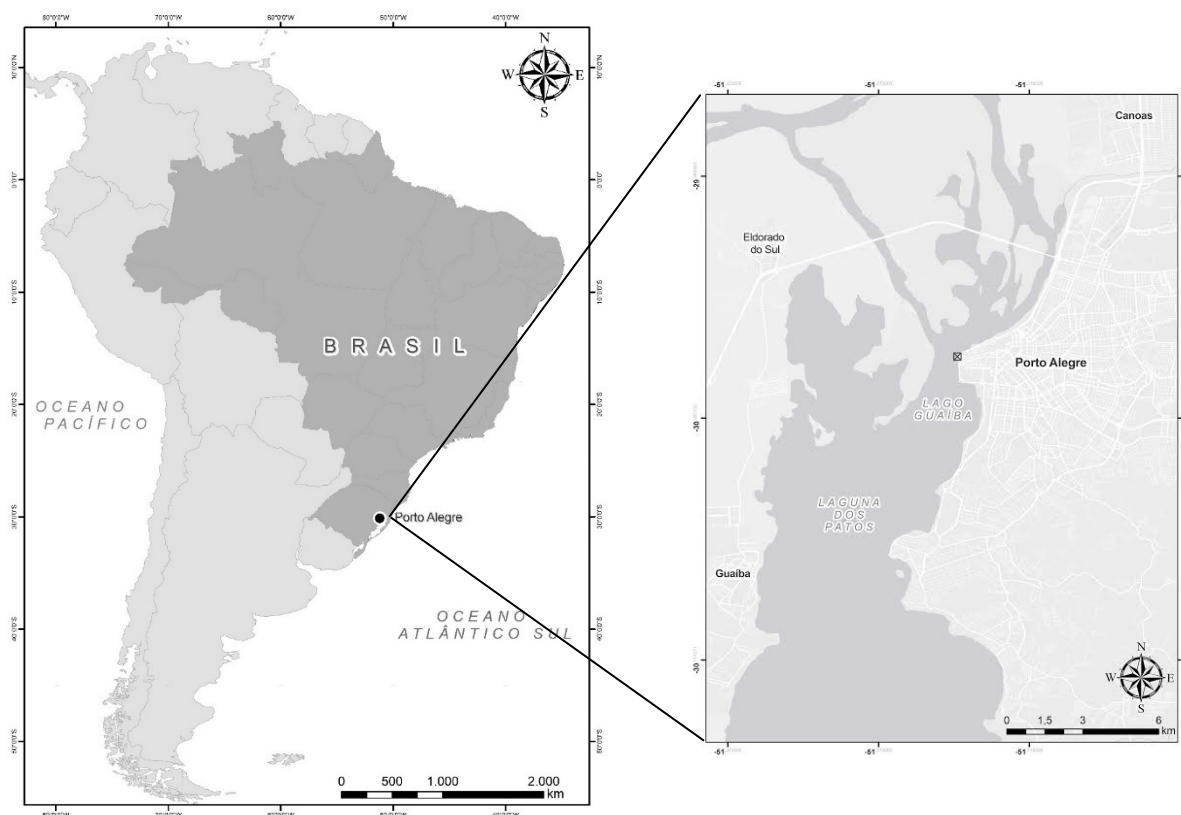


Figura 11- Mapa de localização do ponto de coleta no Lago Guaíba em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. (FONTE: Dados do IBGE, cartografia elaborada por: SANTOS, R.N., Laboratório do Espaço Social, Instituto de Geociências, UFRGS).

4.2 Preparação das amostras

Foram utilizados quarenta mexilhões-dourados agrupados em 8 *pools* de cinco amostras, sendo para cada grupo foi coletado a água interna (AI) e os tecidos (T), separadamente, totalizando 16 *pools* (8 *pools* de AI e 8 *pools* de T). Quinhentos microlitros (500 μ L) de cada *pool* de AI foi transferido para microtubos de 1,5 mL. Aproximadamente 1mg de órgãos internos foi coletada com auxílio de uma pinça e bisturi, após foram macerados em cadinho com areia estéril, 1 mL de tampão fosfato (PBS) e auxílio de pistilo. Após o conteúdo macerado foi transferido para um

microtubo de 1,5 mL. Todos os procedimentos de coleta foram realizados em cabine de fluxo laminar. Os tubos foram misturados sob agitação por 1 min e centrifugados por 10 min a 10 000 x g. Após, os sobrenadantes foram coletados e filtrados em membrana de 0,45 μm com auxílio de uma seringa. As amostras processadas foram mantidas congeladas a -80°C até sua utilização. A figura 12 ilustra o processamento das amostras.

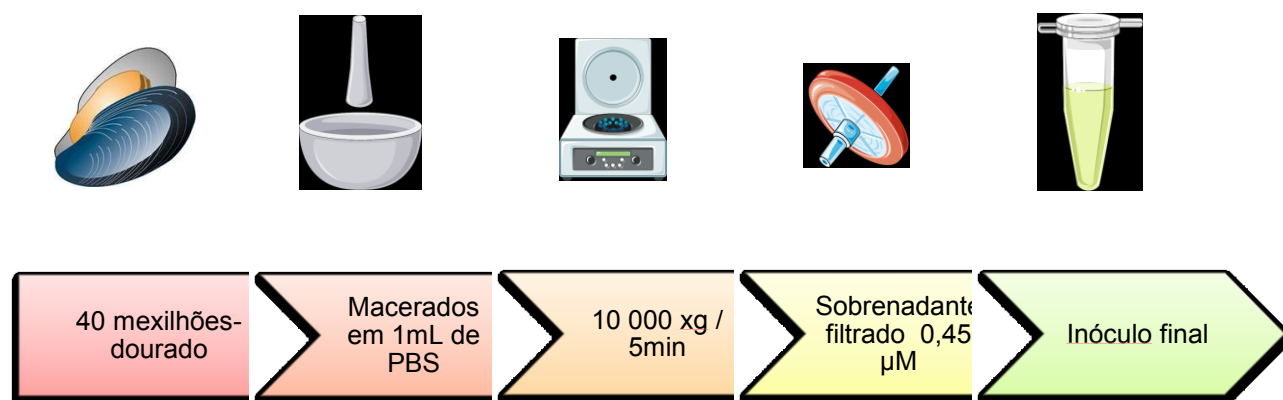


Figura 12- Fluxograma de processamento das amostras de mexilhões-dourados. Apenas os tecidos foram macerados. A água interna foi coletada separadamente e um microtubo de 1,5mL.

4.3 Isolamento viral

Células de *Acanthamoeba polyphaga* P4 empregadas para isolamento viral foram cultivadas com 10 mL de meio PYG (Peptona - 7,5g, extrato de levedura - 0,75g e glicose - 15g/Litro, previamente autoclavado a 121°C por 20 min) a 30°C em garrafas de cultivo celular de 25cm^2 . Aos cultivos, adicionou-se 50 μg de gentamicina. Um dia antes da inoculação, as monocamadas de amebas foram ressuspendidas em PBS, centrifugadas e cultivadas em placas de 24 orifícios contendo aproximadamente 100,000 amebas/orifício. Sobre estas monocamadas foram inoculados 100 μL das

amostras preparadas como descrito no item 4.2 e as placas foram incubadas por até 72h a 30°C. Diariamente os cultivos foram examinados em microscopia ótica em busca do efeito citopático (ECP), e foram realizadas até cinco passagens cegas destes sobrenadantes visando o isolamento viral. A amostra que apresentou ECP indicativo da presença de vírus foi congelada a -80°C.

4.4 Visualização do vírus por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a MET de contraste positivo, cultivos de *A. polyphaga* foram infectados com uma multiplicidade de infecção (m.o.i) de 10. Cultivos de *A. polyphaga* não infectadas foram utilizadas como controle. Após 7 horas de infecção, as monocamadas de células foram lavadas duas vezes com 0,1M de PBS (pH 7,4) e fixadas com 2,5% de Glutaraldeído por uma hora a temperatura ambiente. Após a visualização de ECP na monocamada de células, esta foi ressuspensa com auxílio de micropipeta e centrifugada a 900 x g por 5 minutos. As amebas então foram fixadas em 2% de Tetróxido de Ósmio e embebidas em resina EPON. Secções ultrafinas foram coradas com 2% de Acetato de Urânio e examinadas usando Tecnai G2-Spirit FEI 2006, MET operando com 80 kV, no centro de microscopia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

4.5 Titulação viral e curvas de crescimento

Placas de 24 poços contendo *A. polyphaga* foram previamente cultivadas em PYG. Após 24h de cultivo, o meio PYG foi retirado e foi inoculado 100 µL do isolado viral a uma M.O.I de 10. A inoculação foi feita em triplicata para cada ponto.

Cada ponto é representativo de um valor de tempo, 1-14 horas, 24 e 25 horas pós infecção. Ao passar das horas, o sobrenadante dos poços foi coletado em micro tubos de 1,5 mL e congelados a -80°C para posterior verificação do título viral. Cada ponto foi diluído seriadamente na base 10 por 12 vezes e a titulação de cada um dos pontos foi realizada em quadruplicata em placas de 96 poços contendo aproximadamente 4×10^4 amebas/ $100\mu\text{L}$ de PYG/poço, conforme o modelo abaixo (Figura 13). Os títulos virais foram calculados e expressos em logaritmos por $50\mu\text{L}$ (TCID_{50}), pelo métodos de Reed Muench.

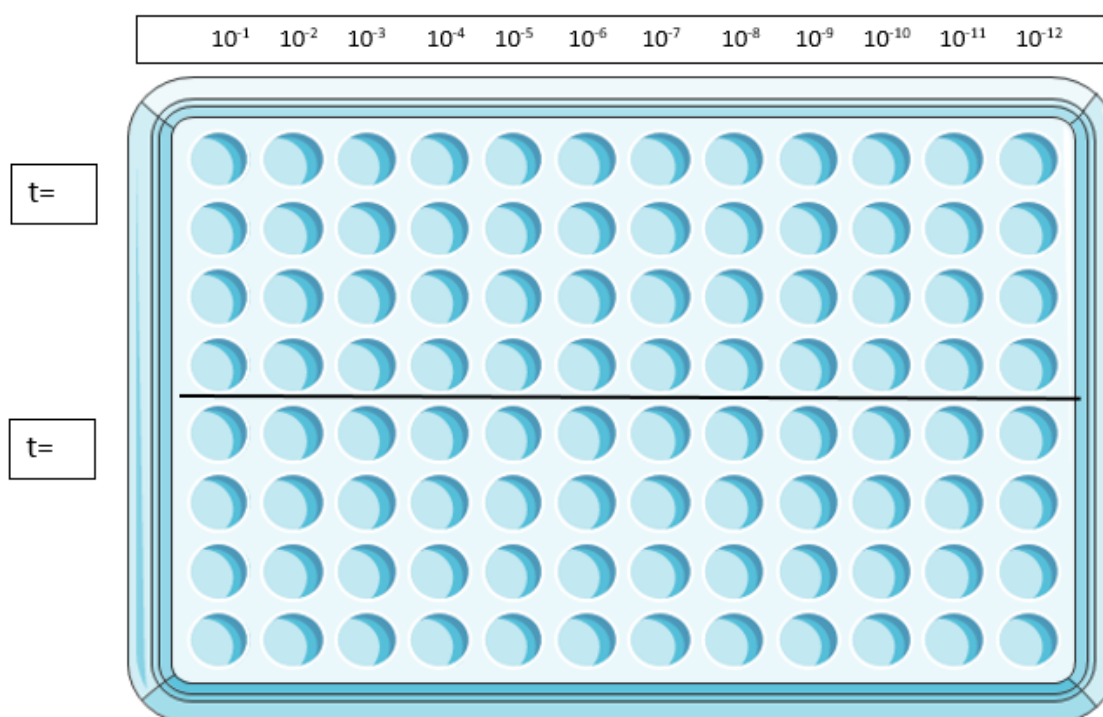


Figura 13 - Disposição dos poços para titulação de cada um dos pontos em quadruplicata (vertical).

4.6 Caracterização molecular do vírus

4.6.1 *Reação em cadeia da polimerase em tempo real*

Com base nos resultados de MET, uma PCR em tempo real foi conduzida no Laboratório de Vírus da UFMG, para confirmação da identidade do vírus em estudo. O alvo da amplificação foi o gene que codifica uma proteína hipotética do genoma dos marseillevirus. Foram utilizados 20 µM dos oligonucleotídeos 5'-TCTGGGAGTGGGCTTTATCT-3' e 5'-AGGGTAATGACCTCGGGTA-3' (Pagnier, I., *et al.*, 2013), 100 ng de DNA molde, 5µL de SYBR GREEN Master Mix® e água para completar o volume de 10µL. As reações foram conduzidas em equipamento OneStep (Applied Biosystem).

4.6.2 *Extração de DNA viral purificado*

Para concentrar e purificar as partículas virais, os sobrenadantes foram ultracentrifugados sobre 5 mL de gradiente de sacarose 25% (25g em 100g de TEN, solução composta de 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl). A ultracentrifugação foi conduzida em equipamento Sorvall ODT- Combi por 33 000 x g, a 4°C por 2 h. Após a ultracentrifugação o sobrenadante foi descartado e os pellets virais foram ressuspensos em 1mL de TEN. Com a finalidade de remover os ácidos nucleicos não protegidos por capsídeos, 400 µL desta preparação foram tratados com 100 U de DNase I (ROCHE) e 100 U de RNase (Invitrogen) a 37°C em banho-maria por 1h. Após o tratamento, o DNA foi extraído por tratamento com fenol, conforme Sambrook & Russel, com pequenas modificações.

4.6.3 Sequenciamento completo e anotação do genoma viral

A amostra de DNA extraída foi avaliada quanto a sua qualidade (razões proteicas e possível contaminação de reagentes orgânicos utilizados durante a extração), em espectrofotômetro (NanoSpectro e Loccus Biotecnologia), visualizada em gel de agarose e quantificada (ng/μL) por método fluorimétrico no equipamento Qubit® (Life technologies), com o kit HS (High sensitive), conforme protocolo descrito pelo fabricante. O DNA viral foi então enviado para o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado na cidade de Eldorado do Sul, RS, para preparo das bibliotecas de DNA com o kit Nextera XT (2x150pb) e posterior sequenciamento em equipamento Illumina MiSeq.

Os genes foram anotados utilizando as ferramentas disponíveis no software Geneious. A edição destes genes foi feita manualmente, a fim de não gerar sequências contendo códons de terminação. A sequência do genoma completo (um arquivo em formato .sqn) foi submetida ao banco de dados pela ferramenta Sequin juntamente com a anotação (formato .tbl), conforme instruções do GenBank em uma tabela de 5 colunas com os intervalos e descrição dos genes (Esta tabela está disponível no apêndice 1). A genômica comparativa entre alguns membros da família *Marseilleviridae* foi feita através da análise da sintonia dos genomas utilizando-se a ferramenta MAUVE, disponível no software Geneious. MAUVE é um programa de alinhamentos múltiplos de genoma com algoritmos otimizados para o caso em que há conservação dos genes das espécies estudadas e fornece uma interface gráfica para visualização.

4.6.4 Montagem e determinação in silico da topologia do genoma viral

As sequências geradas pelo sequenciamento foram *trimadas* no software Geneious e após montadas utilizando-se o “DE NOVO assembly” no Spades 3.1. Também se utilizou o software ABBYS e o próprio Geneious para a montagem. O contig resultante foi analisado quanto à similaridade com genomas de outros vírus gigantes utilizando-se a ferramenta “*map to reference*”. A seguir, como o genoma algum vírus gigantes é circular, buscou-se determinar a topologia genômica do vírus isolado. Para isto foi utilizado o programa Geneious, demonstrando-se com um *Blastx* de uma região do início e do fim da sequência e, caso haja similaridade com o banco de dados, é um indício da circularização da molécula de DNA.

4.6.5 Confirmação da topologia do genoma por PCR

Foram desenhados conjuntos de oligonucleotídeos específicos para amplificação de regiões que confirmariam a circularização do genoma. As reações de PCR foram conduzidas por desnaturação inicial a 94°C, seguida por 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s com a temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeo (conforme mostra a Tabela 1) e 30s de extensão a 72°C seguida por uma extensão final de 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A tabela a seguir mostra as sequências utilizadas e o tamanho dos produtos esperados destas reações.

Tabela 1- Sequência de oligonucleotídeos utilizados para demonstração da circularização do genoma.

PRIMER	SEQUÊNCIA FORWARD	SEQUÊNCIA REVERSA	PRODUTO	TM
ABBYS	5'-CACGACCAATATCACAACGC-3'	5'-TGTTTGTGCGCAGTTTGGCC-3'	842 pb	53°C
GENEIOUS	5'-GACCGTATAATCATCAAGGC-3'	5'-GGATACCTGGATCAATCGC-3'	298 pb	48°C
SPADES	5'-TGTGCGTCCATATCAAAGGC-3'	5'-CAATTTGGGAGAAGTTCGGC-3'	975 pb	56°C

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento viral

Através da coloração de Gram foi possível observar as possíveis fábricas virais, destacadas na figura 14. O vírus isolado induziu efeito citopático evidente, como arredondamento celular, lise das amebas e indução de arranjos celulares em cadeias. Observou-se também uma redução da movimentação das células infectadas em comparação com as células controle. A figura 15 mostra na esquerda o controle de amebas não infectadas e na direita as amebas 24h pós infecção.

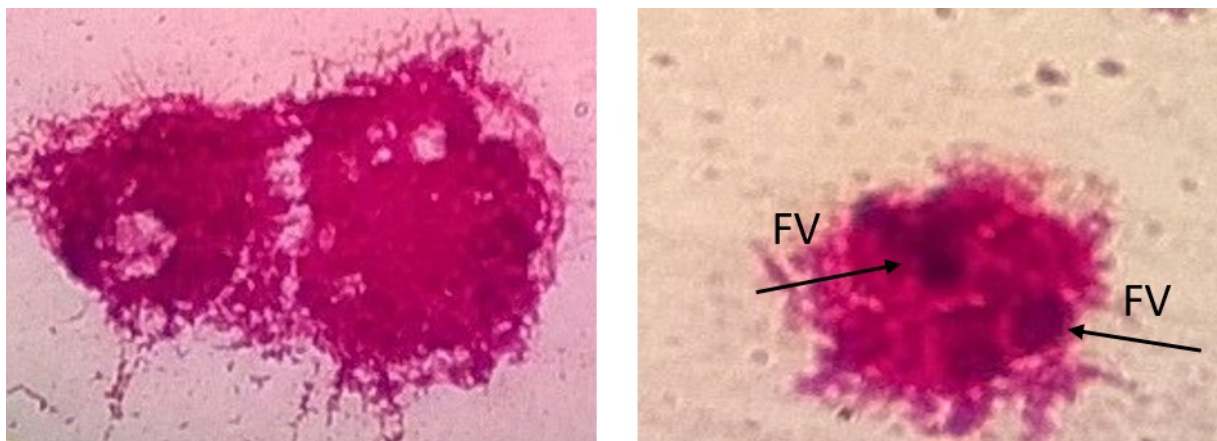


Figura 14- Coloração de Gram. Esquerda: amebas não infectadas. Direita: Amebas infectas mostrando as possíveis fábricas virais no citoplasma (FV). Aumento: 1000x.

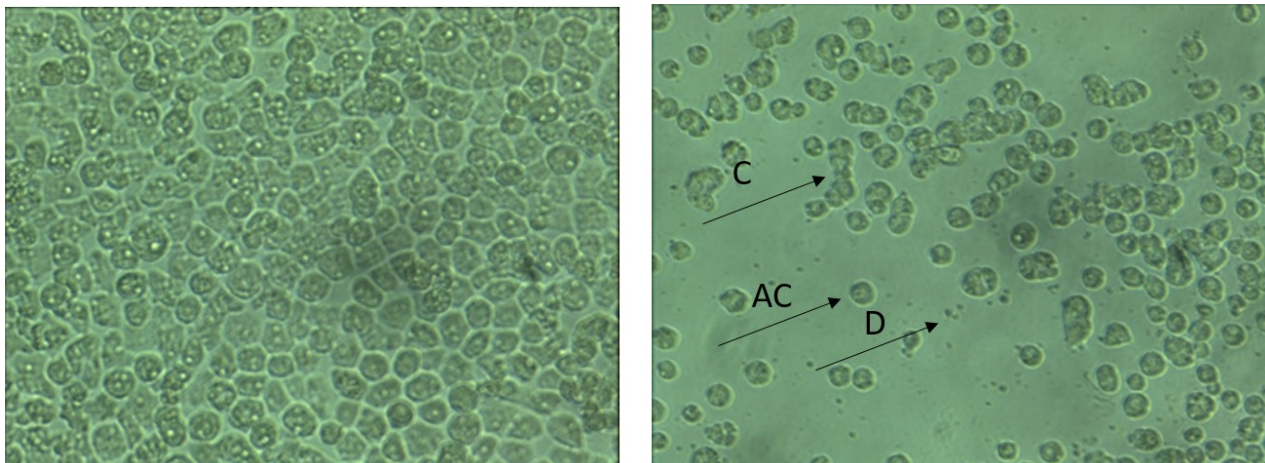


Figura 15- Características do CPE. Esquerda: amebas não infectadas. Direita: C (Grupos em cadeia), AC (arredondamento celular), D (debris). Aumento 100x.

5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas icosaédricas de aproximadamente 200 nm, tamanho característico de outros vírus relatados da família *Marseilleviridae*, como mostrado nas figuras 16a e 16b.

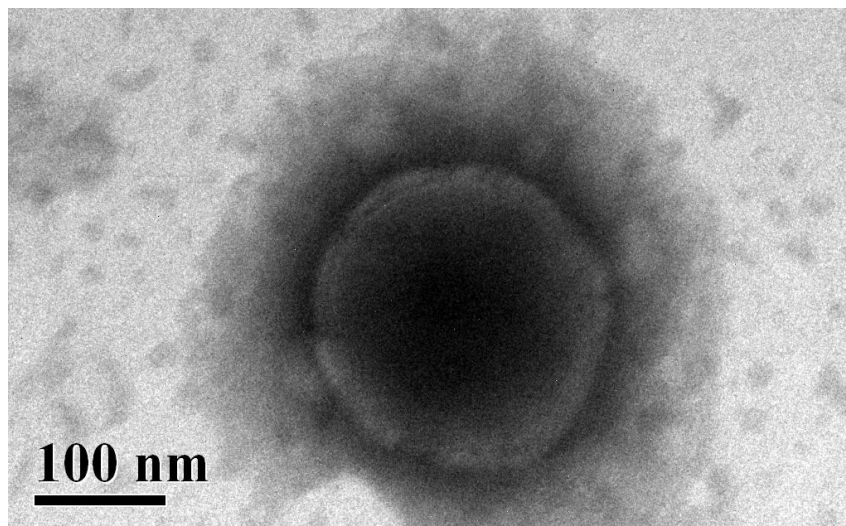


Figura 16a - Partícula viral em MET de contraste positivo. Créditos: UnB.

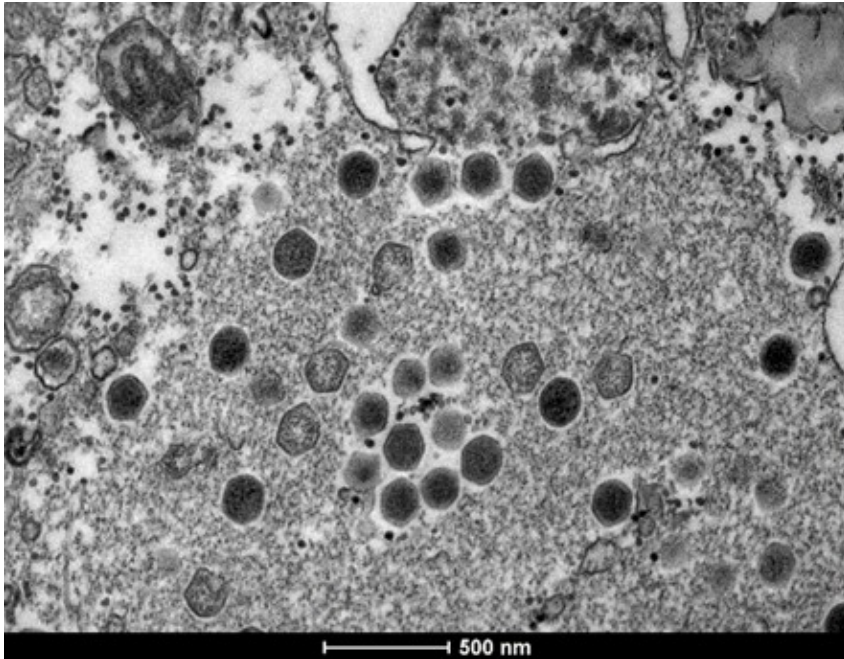


Figura 16b- Partículas virais dentro do citoplasma amebiano em MET de contraste negativo.

5.3 Curva de crescimento *one-step*

A multiplicação viral foi monitorada através da determinação da curva de crescimento do vírus *one step*. Vírus infeccioso começou a ser detectado no meio extracelular a partir de duas horas pós-infecção (pi) em títulos de 10^4 TCID₅₀/50µL. Cinco horas pi o vírus atinge seu título máximo (título em 10^{11} TCID₅₀/50µL) e esses títulos se mantêm até o último ponto de coleta dos sobrenadantes, às 25 horas pi. (Figura 17).

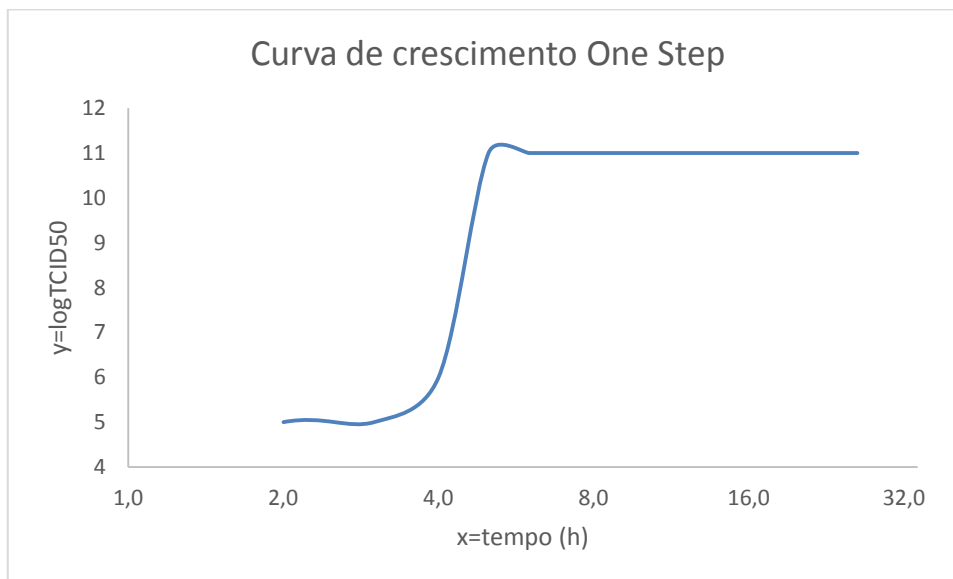


Figura 17- Gráfico da curva de crescimento viral. Eixo y= logTCID₅₀. Eixo x= tempo, medido em horas.

5.4 Qualidade e quantidade do DNA a ser submetido para o sequenciamento

Após extração, o DNA viral foi purificado em kit de colunas ZYMO Research[®], conforme descrição do fabricante. A sua concentração foi medida em 19,2 ng/μL. A figura 18 mostra a foto do gel de agarose contendo o DNA enviado para sequenciamento após purificação e concentração em coluna.

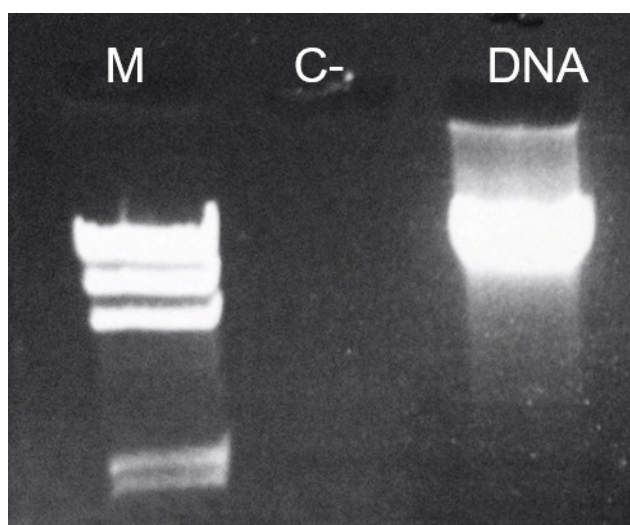


Figura 18. Gel de agarose, 1,5%. Corrida a 80V por 45 minutos. M= marcador: λ clivado com HindIII. C-= Amostra negativa. DNA= Extração de DNA do isolado, amostra enviada para NGS.

5.5 PCR em tempo real para confirmação da família

Conforme descrito anteriormente, uma PCR em tempo real foi realizada no Laboratório de Vírus em MG para identificação do vírus. A PCR mostrou resultado positivo para uma proteína hipotética da família *Marseilleviridae*.

5.6 Sequenciamento completo do genoma viral

O sequenciamento da amostra em plataforma Illumina MiSeq gerou um arquivo com 510,511 *reads*. Estas *reads* foram ordenadas em 3 montadores diferentes: Spades, Geneious e ABBYs, gerando um contig maior de 360,645 bp. A cobertura do genoma sequenciado foi estimada em 217 vezes (calculado a partir do número de *reads* obtidos) ou seja, cada base foi sequenciada 217 vezes neste genoma. O genoma final submetido ao GenBank (Número de acesso: KT835053) corresponde a uma molécula de DNA dupla fita circular de 360,610 pb com tamanho comparável a outros marseillevirus. O novo vírus, pertencente à família *Marseilleviridae*, foi denominado *Golden mussel marseillevirus* (GMAR), fazendo analogia a amostra que foi utilizada para seu isolamento: o mexilhão-dourado. A árvore filogenética a seguir (Figura 19), com base no alinhamento concatenado dos 5 genes core conservados entre os marseillevirus, sugere que o vírus encontrado pertence a uma nova linhagem.

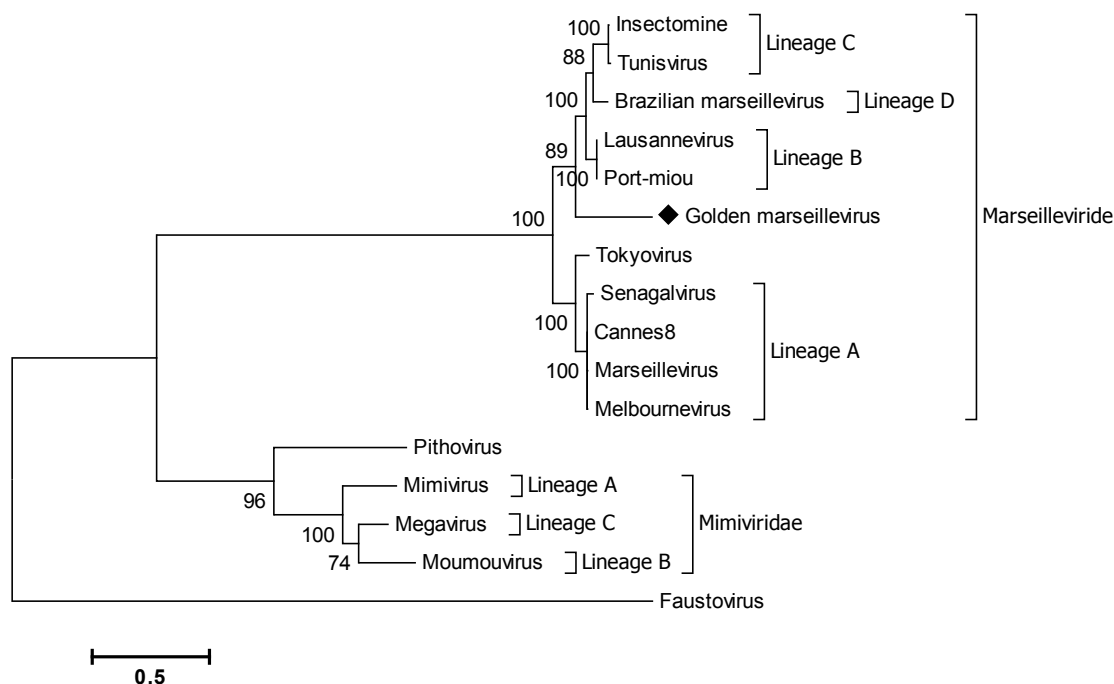


Figura 19- Construção filogenética baseada no alinhamento concatenado dos 5 genes core: DNA polymerase B, proteína maior do capsídeo, VV-A18 helicase, D6/D11 helicase e D5 helicase. A sequência de aminoácidos foi alinhada no Muscle e a árvore construída baseada no método de Maximum Likelihood na matriz JTT. A análise filogenética foi conduzida no MEGA 7. *Acanthamoeba polyphaga mouvovirus* (Número de acesso: 14445686) foi usado para criação da raiz.

5.7 Anotação do genoma

Durante a anotação do genoma, vários métodos foram utilizados para que se obtivesse a anotação final do genoma do vírus descoberto. A anotação final foi feita manualmente no programa Geneious com 296 regiões codificantes (CDS) determinadas. Há diversas regiões do genoma ainda sem identidade conhecida. O arquivo submetido para o GenBank contendo a anotação final do *Golden mussel marseillevirus* encontra-se no apêndice 1 desta dissertação. A identificação da identidade com os outros membros da família pode facilmente ser visualizada na figura 20.

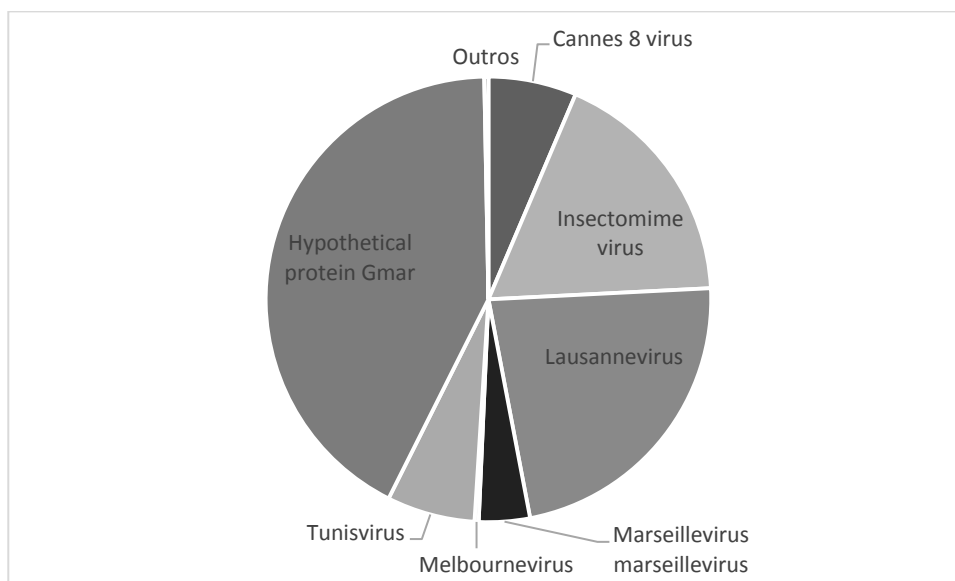


Figura 20- Distribuição dos alinhamentos de proteínas disponíveis no GenBank.

O genoma sequenciado foi analisado quanto à sua sintonia em relação a outros membros da mesma família. Os resultados, demonstrados a seguir (gerados pela ferramenta MAUVE) mostram uma baixa sintonia entre o vírus encontrado e os outros já descritos, conforme podemos observar pelas inversões gênicas. O GMar apresenta uma sintonia maior com o *Lausannevirus* e *Insectomime virus* (Figuras 21 e 23), conforme observado também na identidade de proteínas (Apêndice 1). Em relação ao primeiro marseillevirus descrito o GMar mostrou baixa sintonia, conforme observado na figura 22.

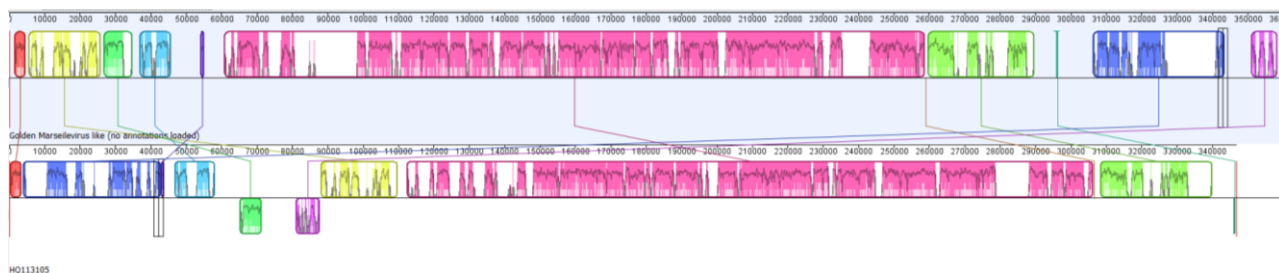


Figura 21. *Golden mussel marseillevirus* x *Lausannevirus*

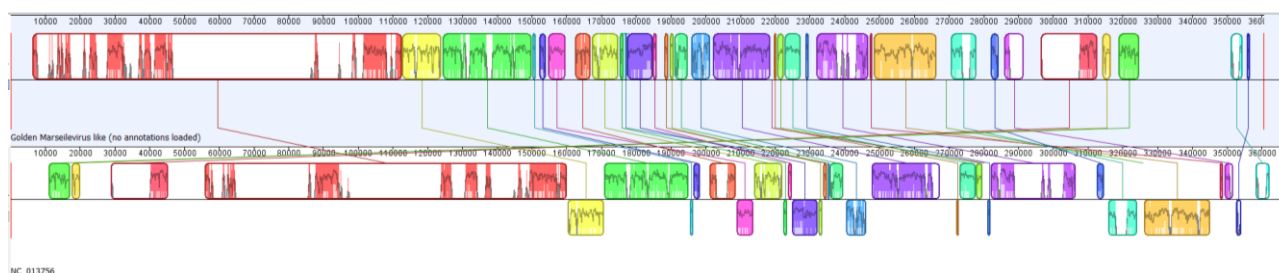


Figura 22. *Golden marseillevirus* x *Marseillevirus marseillevirus*

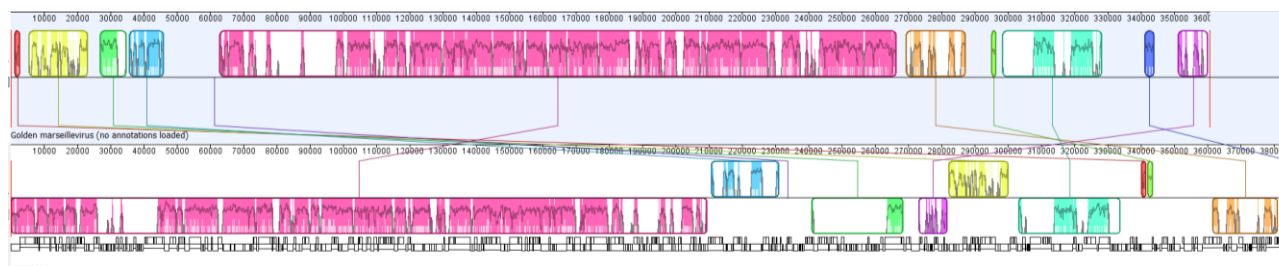


Figura 23- *Golden marseillevirus* x *Insectomime virus*

5.8 Determinação da topologia do genoma viral

Conforme descrito na metodologia, foram utilizados 3 pares de oligonucleotídeos para a confirmação da topologia circular gerada pelos montadores. Os produtos foram sequenciados para confirmação dos resultados. Cada par de oligonucleotídeo faz analogia a um dos algoritmos utilizados na montagem do genoma. A ordem dos montadores é ABBYS, Spades e Geneious, conforme podemos observar na figura 24, pelo alinhamento das montagens geradas no aplicativo MAUVE

dentro do software Geneious. Se amplificarmos uma região de intersecção entre as cores vermelho e verde o genoma apresentar-se-ia na forma linear para 2 montadores, mas circular para um terceiro montador. O mesmo acontece com a região vermelha e amarela, demonstrando que as três montagens se apresentam corretas, pois o genoma é circular e há continuidade entre o início e fim de cada região. A figura 24, mostra o gel de agarose com os *amplicons* obtidos pelas reações de amplificação anteriormente mencionadas.

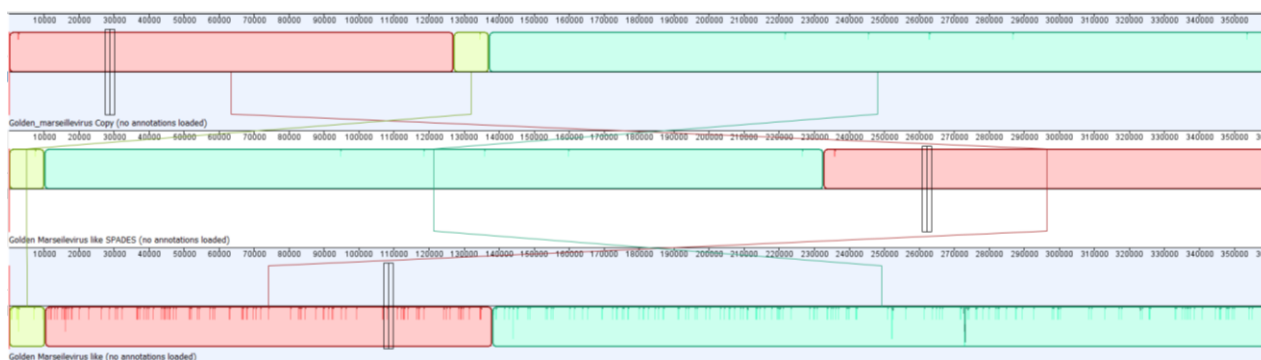


Figura 24- Alinhamento gerado pelo Mauve das sequências geradas por 3 algoritmos diferentes.

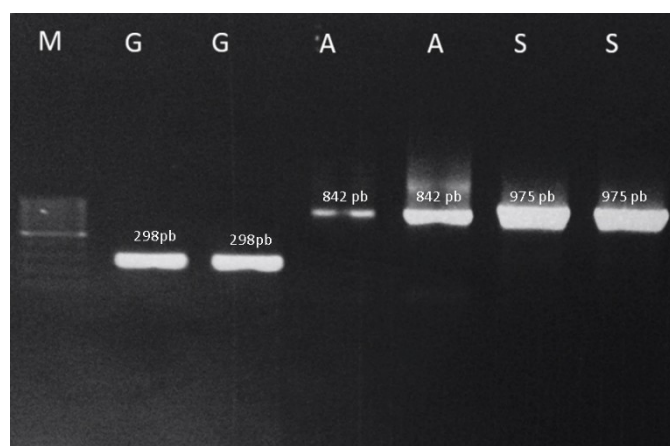


Figura 25- Gel de agarose 1,5%. M= marcador de 100bp. G= reação com oligonucleotídeos Geneious (298pb); A= ABBYS(842 pb), S=Spades(975pb).

In silico, a circularização do genoma também foi comprovada pois há regiões entre a posição inicial e final do genoma com continuidade e identidade no banco de dados, como demonstrado a seguir na imagem 26.

Sequence View Annotations Dotplot (Self) Text View Info

Extract R.C. Translate Add Annotation Allow Editing Annotate & Predict Save

Live Annotate & Predict

Annotate from...
Similarity: 100%
Source: PlasMapper Features
Apply Advanced...

Find ORFs (610 new)
Minimum size: 300
Genetic code: Standard
Start codons: ATG
Include interior ORFs
Apply Restore Defaults

Name: ORF 318 (frame 2)
Type: ORF (Created by ORF Finder)
Length: 2895
Interval: 358,175 -> 361,069 (358,175 -> 954)
Bases: ATGCCGCTCTGTTGGCGCAA...
Genetic code: Standard
Reading frame: 2
Automatic Translation: MFLCAQREKTDISFFVSVF9FLSEACIARSTKTIATATNKKGRFLPQNTTKNLLFFARR
VYVFLFWLREKFFKDISLIANVSLPAVSPGTLVYLSQQLYSSGQWYIAGGDVGPLANQ/AQNTADIATLDSAVSDAISEI
STLNGQQVAVSGVASLSSQV/AQNTSDITLLSGDVSLSQISGFSGDISALQTAVTSNTSSISLQQQVSTNTASISLNTAVSLETT
VSANTASIGTLQTDVSGNTSNIVALQSDVSTLDSQVSTNTANISLGTIVSGLQTSVATNTGNITLLQQQVSTNTGNITLLQQTATNTT
NIGTLQTA VGTNTGNITLLQQQVATLGDVSTLQTDVAANTDIDSLQTSVSTTGNSTLQQQVATNTSNISGNTSNIVALQTDVSDLT
TTVGTNTNIDITLLQQQVSTNTGNITLLQSQVATNTNIGTLQVSTLQTTVGTNTSNITLALQSQVITLLQQQVATNTNIGTLQVSSL
QTTVGTNTNITLLQQQVSTNTGNITLLQQQVATNTQDLSLSSLPFSRDI/VGQNSDITNLLQGSVALNSTDITA
LQGDVSTLQTDVATNTDITGLQTDLSLQTTVGTNTSDITLLQQQVATNTSNISTNTNIGTLQTDVSSLQTSVGTNTSDITLLQQQV
ATNTNISTNTASIGTLQTTVGTNTSNITLLQQQVATNTSNISTNTNIGTLQVSSLQTTVGTNTSNITLLQQQVATNTNIGTLQTT
VGTNTSDITLLQQQVATNTNIGTLQVSSLQVAVQYTRVGGQVASSPFIKSETALNINISLVDANVGGVITSNITNIVPVSGLVMTCTVYIT
SPNTCTSRQVGFYDDAPGSGVGLTPQVITANSGLLTVGAAPFKVPIRSTSSNGLVIFKIPSSGTGNHIVSSSLCSLEISLSDI*

Selected 2,895 bases from base 358,175 to 954 in ORF 318 (frame 2) (ORF 606 of 610).

Figura 26. Tela gerada pelo programa Geneious mostrando uma possível ORF entre as posições final e inicial.

6 DISCUSSÃO

Os membros da família *Marseilleviridae*, família proposta em 2008, apresentam várias propriedades estruturais, biológicas e genéticas em comum. Seus capsídeos são icosaédricos, têm entre 190 e 250 nm de diâmetro, o genoma varia entre 346 kb a 386 kb e é constituído por DNA dupla fita, com conteúdo de G+C entre 43% a 45%. Em relação à topologia do genoma, os marseillevírus até agora identificados apresentam DNA circular, à exceção do *Lausannevirus*, cujo genoma pode se apresentar circular ou linear (Thomas *et al.*, 2011). Além disso, são vírus que infectam e causam lise de *Acanthamoeba* spp., e provavelmente tem um papel importante na dinâmica de populações desses protozoários. Atualmente, com base em comparações de sequências e estrutura do genoma de vírus previamente isolados, a família *Marseilleviridae* está dividida em três linhagens: A, B e C.

Os resultados da análise filogenética, realizada com base na comparação das sequências disponíveis do gene D6/D11 helicase de marseillevírus, indicam que o GMAR difere significativamente das linhagens previamente caracterizadas dessa família (A, B e C). Dessa forma, esses dados sugerem que o vírus GMAR pode ser classificado em uma nova linhagem de marseillevirus, ainda sem outros representantes. Recentemente foi descrito um novo membro da linhagem B, o *Port-Miou* vírus, que apresenta uma grande semelhança com o *Lausannevirus*, mesmo tendo sido isolado em uma região geograficamente distante (Doutre, G., et al. 2015).

O vírus isolado neste trabalho (GMAR) apresentou características estruturais, como tamanho, simetria e tipo de genoma, compatíveis com membros da família *Marseilleviridae*. Além disso, a análise detalhada do genoma do GMAR

permitiu a identificação um genoma circular, com conteúdo de G+C de 43,1%. Essas características são semelhantes às características do genoma do primeiro marseillevirus identificado (NC_013756). *M. marseillevirus*, isolado na cidade que faz referência ao nome em uma torre de resfriamento na França, também apresenta genoma circular e codifica 457 ORFS, com conteúdo de G+C de 44,73% (Aherfi, S., et al. 2014). Entre os marseillevirus já descritos e caracterizados, o isolado do presente estudo trabalho apresentou uma maior sintonia genômica com o vírus isolado do Rio Seine na França (*Lausannevirus*) e com o isolado viral feito em uma larva de inseto (*Insectomime virus*).

A descoberta do GMAR no Lago Guaíba, sul do Brasil, indica que a distribuição geográfica dos marseillevirus é mais ampla do que a já relatada. Até o momento estes vírus foram isolados a partir de amostras de água na França, Tunísia (Aherfi, S., et al. 2014) e amostras de pacientes saudáveis no Senegal. Entretanto, considerando que os vírus gigantes infectam protozoários, e que esses estão amplamente distribuídos na natureza, é muito provável que outros vírus gigantes continuem a ser identificados em regiões geográficas diversas. Em um estudo recente, por exemplo, foi isolado o primeiro marseillevirus no Brasil, em Belo Horizonte, Minas Gerais (Dornas, F. P., et al., 2015). Apesar desse vírus ainda não ter sido completamente caracterizado, o trabalho no qual sua descoberta é descrita mostra como o uso de métodos moleculares e de co-cultivos em diferentes espécies de amebas otimizam a identificação desses vírus (Dornas, F. P., et al., 2015). Este trabalho obteve 69 isolados a partir de 100 amostras, sendo apenas um isolado de marseillevirus. A grande maioria dos vírus isolados eram mimivírus da linhagem A e aproximadamente 50% dos vírus foram isolados em monocamadas de *A polyphaga*.

(Dornas, F. P., et al., 2015).

Este é o primeiro trabalho em que um vírus gigante é isolado a partir de amostras de mexilhões dourados. A detecção do vírus na água interna do bivalve e nos tecidos não implicou em qualquer alteração perceptível nos mexilhões. É provável que a filtração que os mexilhões utilizam para nutrir-se seja responsável pela acumulação de tais vírus em seu interior, semelhante ao que ocorre com outros micro-organismos e fontes de nutrientes. Entretanto, o uso de bivalves como plataforma de detecção/isolamento de vírus gigantes já foi demonstrado. Em um estudo anterior, as ostras mostraram-se excelentes fontes para isolamento de mimivírus, já que também são organismos filtradores, podendo filtrar 400 L de água por dia (Andrade et al. 2015). De acordo com os resultados aqui obtidos, infere-se que o mexilhão-dourado se comporta de forma semelhante às ostras, através da concentração de partículas dispersas no ambiente em que vive. Sendo assim, mexilhões dourados provavelmente podem ser explorados como fonte de novos vírus gigantes, podendo assim auxiliar na identificação da diversidade desses vírus no meio ambiente.

7 CONCLUSÃO

- Este estudo permitiu o isolamento de vírus gigantes a partir de amostras de mexilhões-dourados coletados no Lago Guaíba;
- Foi possível caracterizar o efeito citopático destes vírus, multiplicando-se em *Acanthamoeba*;
- As partículas virais foram caracterizadas por MET, quanto ao seu tamanho (200nm) e simetria icosaédrica;
- A partir do sequenciamento do genoma completo deste vírus, foi possível classificá-lo filogeneticamente, sugerindo-se uma nova linhagem. Sequências com homologia no banco de dados foram identificadas e o genoma anotado foi enviado ao GenBank (Número de acesso: KT835053).

8 REFERÊNCIAS

- Terra, N. R., Lemieszek, B.M., de Lemos, C. T., Leite, E.H., 2. 2007. Presença de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nas bacias hidrográficas do Rio Uruguai e Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil, Fepam em Revista, Porto Alegre, v.1, n.1, p.4-11.
- Abrahão, J. S., et al. 2014. "Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries." *Virology* 11: 120.
- Aherfi, S., et al. 2014. "Complete genome sequence of Tunisivirus, a new member of the proposed family Marseilleviridae." *Arch Virol* 159(9): 2349-2358.
- Aherfi, S., et al. 2014. "The expanding family Marseilleviridae." *Virology* 466-467: 27-37.
- Amato Neto, V. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.
- Andrade, K. R., et al. 2015. "Oysters as hot spots for mimivirus isolation." *Arch Virol* 160(2): 477-482.
- Barbot, V.; Migeot, V.; Quellard, N.; Rodier, M.H.; Imbert, C. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. *Water Research, England*, v.46, p.5707-5714, 2012.
- Boughalmi, M., et al. (2013). "First isolation of a Marseillevirus in the Diptera Syrphidae *Eristalis tenax*." *Intervirology* 56(6): 386-394.
- Campos, R. K., et al. (2014). "Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon." *Virology* 11: 95.
- Carvalho, M. C. C. G., Silval, D.C. G. 2010. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Ciência Rural, Santa Maria*, v.40, n.3, p.735-744, ISSN 0103-8478
- Cataldo, D. H.; Boltovskoy, D. Yearly reproductive activity of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia as inferred' from the occurrence of its larvae in the plankton of the lower Paraná river and the Rio de la Plata estuary (Argentina). *Aquatic Ecology, Dordrecht, Netherlands*, v.34, p.307-317, 2000.
- Caumo, K.; Pens, C.J.; Panatieri, L.F.; Frazzon, A.P.G.; Rott, M.B. 2009. Potentially

pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals of tropical medicine and parasitology*, England, v.103, p.477-485.

Cholewinski, M., et al. 2015. "Presence of potential pathogenic genotypes of free-living amoebae isolated from sandboxes in children's playgrounds." *Folia Parasitol (Praha)* 62.

Claverie, J. M. and C. Abergel. 2009. "Mimivirus and its virophage." *Annu Rev Genet* 43: 49-66.

Claverie, J. M. and C. Abergel. 2010. "Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses." *Trends Genet* 26(10): 431-437.

Colares, E. R. da C. 2002. Diagnóstico e controle do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei*, em sistemas de tratamento de água em Porto Alegre. In: Simpósio Ítalo brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 6, Anais... Vitória, ES.

Colson, P., et al. 2012. "Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales." *Intervirology* 55(5): 321-332.

Darrigran, G. e Ezcurra De Drago, I. 2000. Distribucion el *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (mytilidae), en la cuenca del Plata. Region neotropical. *Medio Ambiente*, Buenos Aires, 13 (2): 75-79.

Dornas, F. P., et al. 2015. "Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa." *Front Microbiol* 6: 1086.

Doutre, G., et al. 2014. "Genome analysis of the first *Marseilleviridae* representative from Australia indicates that most of its genes contribute to virus fitness." *J Virol* 88(24): 14340-14349.

Doutre, G., et al. 2015. "Complete Genome Sequence of a New Member of the *Marseilleviridae* Recovered from the Brackish Submarine Spring in the Cassis Port-Miou Calanque, France." *Genome Announc* 3(6).

Ghigo, E.; Kartenbeck, J.; Lien, P.; Pelkmans, L.; Capo, C.; Mege, J.L.; Raoult D. 2008. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathogens*, United States, v.13, n.6, p.1-17.

Greub, G.; Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, United States, v.17, p.413-433.

Iovieno, A.; Ledee, D.R.; Miller, D.; Alfonso, E.C. 2010. Detection of bacterial endosymbionts in clinical acanthamoeba isolates. *Ophthalmology*, United States, v.117, n.3, p.445-452.

Katzourakis, A. and A. Aswad. 2014. "The origins of giant viruses, virophages and their relatives in host genomes." *BMC Biol* 12: 51.

Kerepesi, C. and V. Grolmusz. 2015. "Giant viruses of the Kutch Desert." *Arch Virol*.

KODET, R.; NOHÝNKOVÁ, E.; TICHÝ, M.; SOUKUP, J.; VISVESVARA, G.S. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* in a Czech child: description of the first case from Europe. *Pathology, research and practice*, Germany, v.194, n.6, p.423-429, 1998.

Kuiper, M.W.; Valster, R.M.; Wullings, B.A; Boonstra, H.; Smidt, H; Kooij, D.V.D. 2006. Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in Surface Water by Using Real-Time PCR. *Applied and environmental microbiology*, United States, v.72, n.9, p. 5750–5756.

La Scola, B., et al. 2003. "A giant virus in amoebae." *Science* 299(5615).

Lorenzo-Morales, J.; Ortega-Rivas, A.; Foronda, P.; Martínez, E.; Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology research*, Germany, v.95, n.4, p. 273-277.

Mansur M. C. D.; Darrigan, C. P. dos S.; Heydrich, I.; Callil, C. T.; Cardoso, F. R. 2003. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v.20 n.1 p.75-84.

OBEID, W. N. et al. 2003. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba*: relato de caso. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v. 66, n. 6, p. 876-880.

Oliveira, M. D., et al. 2015. "Colonization and Spread of *Limnoperna fortunei* in South America." Springer International Publishing Switzerland. Springer Series in Invasion Ecology.

Pagnier, I., et al. 2013. "A decade of improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae isolation from amoeba." *Intervirology* 56(6): 354-363.

Raoult, D.; Audic, S.; Robert, C.; Abergel, C.; Renesto, P.; Ogata, H.; LA Scola, B.; Suzan, M.; Claverie, J.M. 2004. 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. *Science, United States*, v.306 p. 1344-1350.

Raoult, D.; LA Scola, B., Birtles, R. 2007. The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, United States*, V.45, n.1, p.95-102.

Rodrigues, R. A., et al. 2015. "Mimivirus Fibrils Are Important for Viral Attachment to the Microbial World by a Diverse Glycoside Interaction Repertoire." *J Virol* 89(23): 11812-11819.

Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 631-632.

SIMEÃO, C. M. G.; MARTINEZ, C. B.; FORMAGIO, P. S. 2006. **Limnoperna fortunei: situação atual e perspectivas futuras**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS E MÉDIAS CENTRAIS HIDRELÉTRICAS. Florianópolis. Anais. Florianópolis: Comitê Brasileiro de Barragens, 2006.

Terra, N.R.; Lemieszek, M.B.; Lemos, C.T. de & Leite, E.H. 2007. Presença de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nas bacias hidrográficas do Rio Uruguai e Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Fepam em Revista*, Porto Alegre, 1(1):12-19.

Thomas, V., et al. 2011. "Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets." *Environ Microbiol* 13(6): 1454-1466