

ANA ANGÉLICA CELSO DE LIMA BARRETO DA SILVA

ESTUDO DA MODULAÇÃO DA MAQUINARIA DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM
ACANTHAMOEBA CASTELLANII INFECTADAS POR VÍRUS GIGANTES



**Monografia apresentado ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade do Rio de Janeiro, como
pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas;
Microbiologia e Imunologia**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2024

Trabalho realizado no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Juliana Reis Cortines e coorientação de Gabriel Henrique Pereira Nunes

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

394e da Silva, Ana Angélica Celso de Lima Barreto
ESTUDO DA MODULAÇÃO DA MAQUINARIA DE SÍNTESE DE
PROTEÍNAS EM ACANTHAMOEBA CASTELLANII INFECTADAS
POR VÍRUS GIGANTES / Ana Angélica Celso de Lima
Barreto da Silva. -- Rio de Janeiro, 2024.
35 f.

Orientadora: Juliana Reis Cortines.
Coorientador: Gabriel Henrique Pereira Nunes .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Vírus Gigante. 2. Tupanvírus. 3. Acanthamoeba
castellanii. 4. Síntese de Proteínas. I. Reis
Cortines, Juliana , orient. II. Pereira Nunes ,
Gabriel Henrique, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): ANA ANGÉLICA CELSO DE LIMA
BARRETO DA SILVA**

DRE: 119040220

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanzza (Presidente)
Prof. Diego de Souza Gonçalves
Prof. Victor Alejandro Essus
Prof. Maite Vaslin de Freitas Silva (Suplente)

**Título da Monografia: “Estudo da modulação da maquinaria de síntese de
proteínas em células de *Acanthamoeba castellanii* infectadas por
vírus gigantes”**

Local: Sala E-44, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 10 de dezembro de 2024 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2024.

NOTA:

9,5

Banca Examinadora



Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanzza (Presidente)

9,5



Prof. Diego de Souza Gonçalves

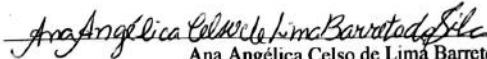
9,5



Prof. Victor Alejandro Essus

Prof. Maite Vaslin de Freitas Silva (Suplente)

Aluno(a):



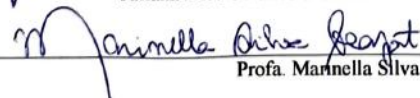
Ana Angélica Celso de Lima Barreto da Silva

**Orientador(a)
(e coorientador):**



Juliana Reis Cortines e Gabriel Henrique Pereira Nunes

**Coordenadora de
TCC:**



Prof. Marinella Silva Laport

AGADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo amor, apoio e encorajamento incondicional em cada etapa da minha vida. Em especial, ao meu pai, Osvaldo Diogo da Silva, minha mãe, Ana Iris Celso de Lima Barreto que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a persistir nos meus objetivos.

Manifesto minha profunda gratidão à minha orientadora, Professora Juliana Reis Cortines, e ao meu coorientador, Gabriel Henrique Pereira Nunes, por aceitarem me guiar durante essa jornada acadêmica, oferecendo paciência, conselhos valiosos e incentivos durante esse ano. Estendo meu agradecimento ao Professor Malouri, por suas contribuições e orientações enriquecedoras ao longo deste trabalho.

Agradeço também aos colegas ICs do LAVEM, cuja convivência, troca de conhecimentos e colaboração tornaram este percurso ainda mais significativo.

Por fim, meu sincero agradecimento aos membros da banca avaliadora, que gentilmente aceitaram o convite para contribuir com seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho.

RESUMO

ANA ANGÉLICA CELSO DE LIMA BARRETO DA SILVA

ESTUDO DA MODULAÇÃO DA MAQUINARIA DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* INFECTADAS POR VÍRUS GIGANTES

Orientadora: Juliana Reis Cortines

Coorientador: Gabriel Henrique Pereira Nunes

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O Tupanvírus, é um vírus gigante brasileiro. Ele possui um capsídeo pseudo-icosaédrico coberto por fibrilas e uma cauda cilíndrica. Seu principal hospedeiro é a *Acanthamoeba castellanii*, embora também infecte outros hospedeiros ameboides. Estudos indicam que, durante infecção com o Tupanvírus (*Tupanvirus salinum*) ocorre *shut-down* ribossômico do hospedeiro, uma resposta citotóxica, para favorecer a síntese do RNA ribossomal do vírus. Além disso, o vírus é tolerante à cicloheximida (CHX), um antimicrobiano que inibe a síntese proteica em células eucarióticas. Porém esse mecanismo é ainda pouco compreendido. O genoma do Tupanvírus contém um conjunto significativo de genes relacionados à tradução de proteínas, sugerindo que ele utiliza vias alternativas para garantir a síntese proteica ou possui estratégias para bloquear os efeitos da CHX. O objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos de ação da CHX no ciclo replicativo do Tupanvírus, avaliando sua dependência da maquinaria de síntese proteica do hospedeiro e como diferentes concentrações e tempos de exposição à CHX influenciam a viabilidade celular e o processo de infecção viral. Para isso, culturas de *A. castellanii* foram mantidas em meio PYG a 28°C até atingirem confluência. Ensaios de infecção e purificação do Tupanvírus foram realizados, seguidos de testes com CHX para avaliar a viabilidade celular e o impacto na replicação viral. A produção de proteínas virais e hospedeiras foram analisadas na presença e ausência do inibidor. Os ensaios mostraram que, na menor concentração testada (10 µg/mL), ocorre infecção. Em 25 µg/mL, as células recuperam o estado de trofozoíto - estado ativo e móvel da célula - em 48 horas, com atraso na infecção. Porém, em concentrações elevadas de CHX (100, 250 e 500 µg/mL) são citotóxicas, alterando a morfologia celular sem causar lise. Esses resultados indicam que a infecção pelo Tupanvírus ocorre nas menores concentrações testadas, o que sugere uma adaptação do vírus a CHX, ou que a meia vida da droga estaria impedindo sua eficácia nessas concentrações. Para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação do Tupanvírus durante a infecção, mais testes precisam ser realizados, revelando aspectos fundamentais para a biologia do Tupanvírus e esclarecer como a maquinaria celular do hospedeiro é manipulada para assegurar a replicação eficiente do Tupanvírus.

Palavras-chave: Vírus Gigante; Tupanvírus; *Acanthamoeba castellanii*; Síntese de Proteínas

ABSTRACT

ANA ANGÉLICA CELSO DE LIMA BARRETO DA SILVA

STUDY OF THE MODULATION OF THE PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY IN *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* INFECTED BY GIANT VIRUSES

Advisor: Professora Juliana Reis Cortines

Co-advisor: Gabriel Henrique Pereira Nunes

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Tupanvirus is a Brazilian giant virus. It has a pseudo-icosahedral capsid covered by fibrils and a long cylindrical tail. Its main host is *Acanthamoeba castellanii*, although it can also infect other amoeboid hosts. Studies indicate that the tupanvirus (Tupanvirus salinum) can induce ribosomal shutdown in its host, a cytotoxic response that facilitates the synthesis of its own ribosomal RNA. Additionally, the virus is tolerant to cycloheximide (CHX), an antimicrobial and antifungal compound that inhibits protein synthesis in eukaryotic cells by targeting the ribosomal system. The mechanisms underlying this tolerance remain poorly understood. The tupanvirus genome contains a significant set of protein translation-related genes, suggesting it uses alternative pathways to ensure protein synthesis or employs strategies to counteract CHX effects. This study aims to investigate CHX's mechanisms of action on the tupanvirus replication cycle, assessing its reliance on the host protein synthesis machinery and how different concentrations and exposure times to CHX affect cellular viability and viral infection processes. To achieve this, *A. castellanii* cultures were maintained in PYG medium at 28°C until reaching confluence. Infection assays and tupanvirus purification were performed, followed by CHX testing to evaluate cell viability and the impact on viral replication. The production of both viral and host proteins was analyzed in the presence and absence of the inhibitor. These experiments showed that in lowest concentration tested (10 µg/mL), infection occurs. At 25 µg/mL, cells return to their trophozoite -active and mobile - state within 48 hours, with delayed infection. But, in high CHX concentrations (100, 250, and 500 µg/mL) are cytotoxic, altering cellular morphology without causing lysis. These results suggest that tupanvirus infection occurs at the lowest concentrations tested, indicating either a viral adaptation to CHX or that the drug's half life is preventing its effectiveness at the concentrations. To gain a deeper understanding of the mechanisms of action of tupanvirus during infection, further testing is needed, revealing fundamental aspects of tupanvirus biology and clarifying how the host cell machinery is manipulated to ensure efficient replication of the virus.

Key-words: Giant Virus; Tupanvirus; *Acanthamoeba castellanii*; Protein Synthesis

RESUMO PARA LEIGOS

ANA ANGÉLICA CELSO DE LIMA BARRETO DA SILVA

ESTUDO DA MODULAÇÃO DA MAQUINARIA DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* INFECTADAS POR VÍRUS GIGANTES

Orientador: Juliana Reis Cortines

Coorientador: Gabriel Henrique Pereira Nunes

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os vírus são conhecidos por serem menores que as bactérias, mas em 2003 essa ideia foi desafiada com a descoberta do mimivírus, o primeiro "vírus gigante". Esses vírus podem ser vistos ao microscópio óptico, algo que não é comum para outros vírus. Entre eles, destaca-se o Tupanvírus, descoberto no Brasil. A infecção pelo Tupanvírus ocorre em organismos unicelulares chamados amebas, como a *Acanthamoeba castellanii*, mas também pode infectar outros organismos. O vírus possui características incomuns, como uma cauda com fibrilas. Esse vírus é constituído de um aparato de produção de proteínas bastante completo e induz a desativação de ribossomos - estruturas que produzem proteínas - da célula hospedeira para priorizar a fabricação de seus próprios componentes. Este processo ocorre mesmo na presença de drogas que bloqueiam a produção de proteínas em células eucarióticas. Este comportamento incomum sugere que o vírus possui estratégias de adaptação ou resistência. Com isso, este estudo busca entender qual a relação do Tupanvírus nesse processo de fabricação dos seus componentes na célula ao investigar diferentes concentrações da substância e os impactos da infecção viral para a célula hospedeira. Os experimentos iniciais mostram que doses altas de um antimicrobiano como a cicloheximida, prejudicam a célula, mas sem destruí-la. Já em doses baixas, a célula é infectada, indicando uma possível adaptação tanto do Tupanvírus quanto da ameba. Os resultados tentam compreender como esse vírus manipula as células para sobreviver, abrindo caminho para mais pesquisas sobre sua biologia e a os impactos do vírus gigante na biodiversidade.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
RESUMO PARA LEIGOS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico	1
1.2 Descoberta dos vírus gigantes	3
1.3 Diversidade de vírus gigantes.....	3
1.3.1 Tupanvírus	6
1.4. <i>Acanthamoeba spp.</i>	9
1.5 Cicloheximida.....	10
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Cultura de célula.....	12
4.2 Purificação de vírus	12
4.3 Teste com cicloheximida	13
4.4 Teste com cicloheximida em células infectadas.....	13
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Efeitos citotóxicos e inibitórios observados em células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> tratadas com CHX.....	14
5.2 Análise de infecção de células de <i>A. castellanii</i> tratada com CHX.....	18
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÃO.....	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
APÊNDICE	27

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os vírus podem ser encontrados em diferentes ecossistemas, seja no ar, no solo e nos oceanos. No entanto, antes do estudo específico sobre esses agentes, a ideia de que existiam microrganismos causadores de doenças que não podiam ser observados ao microscópio e que não se comportavam como bactérias ou fungos ainda não era reconhecida. Foi observando doenças de plantas, que o patologista Adolf Mayer constatou que a seiva de uma folha de tabaco doente era capaz de transmitir a doença para uma folha saudável. Porém, o patógeno não era observável em microscopia (Mayer, 1886).

Embora, soubesse que havia um patógeno envolvido, Mayer não conseguia isolá-lo ou cultivá-lo de maneira pura como faria com fungos ou bactérias. Partindo dos experimentos de Mayer, posteriormente, Dmitri Ivanowvski filtrou a seiva de uma folha acometida pela doença do mosaico em tabaco em filtros menores, que impediam a passagem de bactérias, e adicionou a uma folha saudável que foi acometida pela doença, mas o pesquisador concluiu que eram toxinas bacterianas (Ivanowvski, 1892).

Após uma longa investigação, com as análises de Mayer e Ivanowsky da doença do mosaico em planta de tabaco, o químico Martinus Beijerinck constatou que o principal causador da doença era algo completamente distinto e único de qualquer microrganismo da época, estabelecendo que esse era incapaz de crescimento independente e, por isso, necessitando de célula hospedeira para replicação, cunhando o termo vírus (Beijerinck, 1898). Esta descoberta estabeleceu as bases e abriu caminhos para o estudo da virologia (Bos, 1999; Arteinsten e Arteinsten, 2012).

A partir de então, os vírus passaram a ser reconhecidos como entidade biológica menor que uma bactéria, filtrável, não observável em microscopia e incapaz de ser cultivado na ausência de células vivas, em meio de cultura padrão. Durante a década de 1950, as definições que se tinham sobre vírus eram de que se tratava de algo simples, desprovidos de maquinaria para replicação e metabolismo próprio, além de possuir material genético encapsulado por uma casca proteica. A partir da descoberta e caracterização dos vírus, muitas doenças da época puderam ser estudadas e elucidadas sob uma nova perspectiva. Isso contribuiu para um rápido desenvolvimento de vacinas e de forma eficaz contra os flagelos virais da época, podendo erradicar moléstias graves, como o sarampo, rubéola e pólio. Entretanto, dizer que os vírus são filtráveis acabava por limitá-los, e essas definições foram questionadas quando, posteriormente,

foi descoberto os vírus gigantes que infectam amebas, como o *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) em 2003, **Figura 1**. A partir disso pode-se observar complexidades genéticas, proteômicas e estruturais que não se pensava ser possível para vírus (Colson *et al.*, 2017).

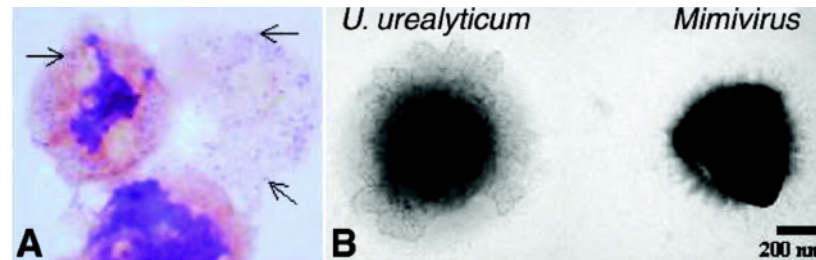


Figura 1- Imagens da primeira amostra isolada de vírus gigantes. **A.** Imagem da amostra de vírus gigante *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* corada em métodos de coloração para identificar bactérias Gram-positivas. **B.** Microscopia eletrônica comparando uma bactéria *U. urealyticum* e o vírus gigante isolado (Mimivirus). Imagem modificada de La Scola *et al.*, 2003

Portanto, atualmente, define-se os vírus como um arranjo molecular subcelulares altamente especializados. São dependentes de maquinaria celular hospedeira para replicação sendo inativos metabolicamente fora da célula. Estruturalmente, um vírus é composto por partícula viral, um material nucleico (DNA ou RNA) protegido por uma capa proteica. Podem ser constituídos de um envelope lipídico e possuir glicoproteínas. **Figura 2.** (Jawetz *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015).

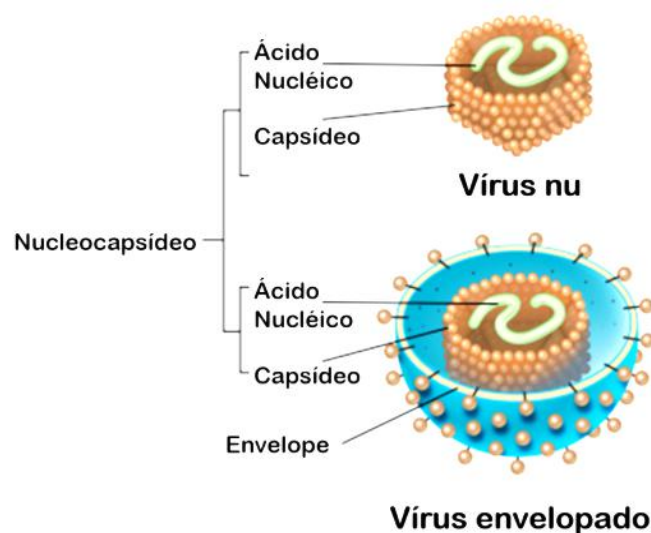


Figura 2. Ilustração de uma partícula viral. Representação ilustrativa da estrutura básica de vírus, envelopados e não envelopados. Imagem adaptada do site da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *Você sabe o que é um vírus?* Disponível em: <https://www.ufrgs.br/microbiologando/voce-sabe-o-que-e-um-virus/>. Acesso em: 29 nov. 2024

1.2 Descoberta dos vírus gigantes

Os vírus gigantes foram descobertos, relativamente, há pouco tempo, tendo sido isolados pela primeira vez no ano de 1992 durante uma investigação de casos de pneumonia em um Hospital em Bradford, na Inglaterra. Inicialmente, devido ao seu tamanho equiparável ao de bactérias, pensou-se que se tratava de uma durante os ensaios de cultivo e identificação de microrganismos. No entanto, as amostras não cresciam em meio de cultura padrão para bactérias e o sequenciamento de PCR usando *primers* específicos 16S, utilizados para identificar DNA bacteriano dava negativo. Observou-se que não eram tais microrganismos, o que suscitou grande interesse científico. (La Scola *et al.*, 2003)

Somente 11 anos depois, foi possível identificar o agente das amostras coletadas: um vírus gigante, nomeado como *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, **Figura 1-A**. Este vírus notabilizou-se pelo seu tamanho excepcional, 400nm de diâmetro, um capsídeo de dimensões que impedia sua passagem em filtros de poro de 0,2µm de diâmetro e um material genético de DNA de aproximadamente 1,2 Mbp. Dessa forma, o vírus foi-classificado em uma família criada para incorporar esses vírus gigantes, família *Mimiviridae*, foi incorporado ao grupo de Vírus Nucleocitoplasmáticos de Grande DNA (NCLDV) (La Scola *et al.*, 2003; Abrahão *et al.*, 2014). Esse, posteriormente, deu origem ao filo *Nucleocytoviricota* (Aylward *et al.*, 2023). Essa notável descoberta pôde expandir o entendimento dos limites e diversidade de vírus, impulsionando novas pesquisas e debates no campo da microbiologia e virologia.

1.3 Diversidade de vírus gigantes

Desde a identificação do primeiro vírus gigante, foi possível ampliar o entendimento sobre os vírus. Esses vírus apresentam grande complexidade genética e morfológica, sendo capazes de infectar para uma ampla gama de eucariotos, inclusive protistas. Dentro desse grupo, diferentes famílias de vírus gigantes têm sido identificadas, como *Mimiviridae* e *Pandoraviridae* (Schulz *et al.*, 2020). Além disso, a busca por vírus em ambientes cada vez mais exóticos permitiu a descoberta de dois vírus gigantes, de famílias distintas, em um permafrost siberiano de 30.000 anos, como o *Pithovirus sibericum* e o *Mollivirus sibericum*.

A família *Mimiviridae* foi uma das primeiras a ser descritas, e inclui exemplos como o Samba vírus, o *Cafeteria roenbergensis vírus* e o Tupanvírus - que será mais detalhado na próxima sessão. O Samba vírus, evidenciado na **Figura 3**, é o primeiro mimivírus isolado no Brasil, em um afluente do rio Amazonas, o Rio Negro. Foi descrito que esse vírus possui proteínas relacionadas com metabolismo celular e proteínas reguladoras, possuindo 4

aminoacil-tRNA-sintetase e 6 de RNA transportadores. Como parasita celular obrigatório, isso sugere um grau de autonomia para esses vírus. (Campos *et al.*, 2014; Assis *et al.*, 2015).

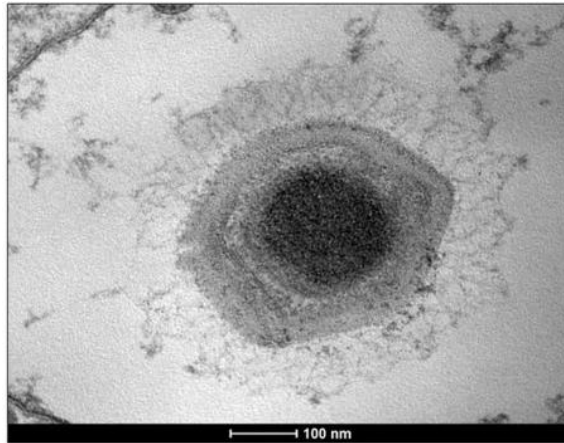


Figura 3. Imagem de partícula de Samba vírus. Microscopia eletrônica de transmissão de partícula de Samba vírus. Barra de escala 100nm. Imagem de Campos *et al.*, 2014.

O *Cafeteria roenbergensis* vírus, representado na **Figura 4**, foi isolado de amostras no Oeste do Golfo do México e também pertence a família *Mimiviridae*. É capaz de infectar o protista flagelado fagocítico marinho, *Cafeteria roenbergensis*. Ele possui genes previstos em processos celulares como síntese de RNAm, reparo de DNA, transcrição, tradução, modificação de proteínas e metabolismo de carboidratos do DNA, o que indica que esse vírus possui uma autonomia na estratégia de propagação durante a infecção (Fischer *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014).

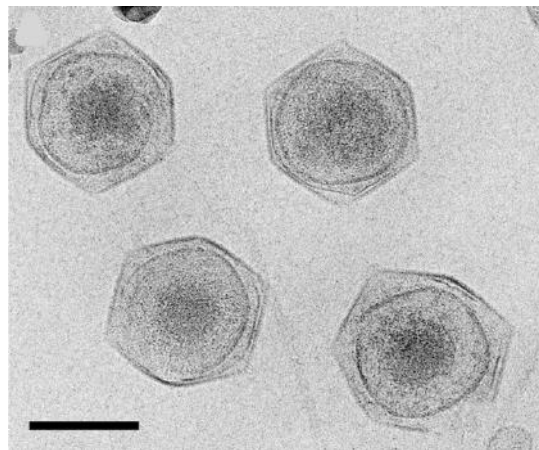


Figura 4. Imagem de partícula viral de *Cafeteria roenbergensis* vírus. Imagens de criomicroscopia eletrônica do vírus *Cafeteria roenbergensis*. Barra de escala 200 nm. Imagem adaptada de Xiao *et al.*, 2017.

Da família *Pandoraviridae*, podemos destacar o *Pandoravirus salinus* e *Pandoravirus dulcis*. O primeiro foi isolado de uma amostra de sedimentos marinhos da costa central do Chile, enquanto o segundo se originou perto de Melbourne na Austrália, do fundo de uma lagoa doce. Com morfologia ovóide, representado na **Figura 5**, e uma abertura apical, que introduz o

conteúdo interno da partícula viral ao citoplasma da célula hospedeira através do canal formado pela membrana interna com a do vacúolo (Abergel *et al.*, 2015). O Pandoravírus não possui genes necessários de replicação de DNA, dependendo da maquinaria celular do núcleo da célula do hospedeiro (Nadège *et al.*, 2013).



Figura 5. Imagem de um Pandoravírus. Microscopia eletrônica de varredura caracterizando a morfologia ovóide do Pandoravirus. Barra de escala de 100nm. Imagem adaptada de Abergel *et al.*, 2015.

Dois vírus se destacam, o *Mollivirus sibericum*, na **Figura 6-A**, e o *Pithovirus sibericum*, na **Figura 6-B**. Ambos isolados de condições consideradas extremas como em permafrost siberiano de 30.000 anos. É surpreendente que esses vírus mantivessem sua infectividade mesmo após estarem congelados por tanto tempo. Porém, é preocupante no cenário atual de aquecimento global e mudanças climáticas, que outros vírus possam ressurgir de um permafrost, inclusive vírus potencialmente patogênicos, caso ocorra descongelamento significativo desses ecossistemas polares (Aherfi *et al.*, 2016; Legendre *et al.*, 2015). Com isso, é de suma importância o estudo e as implicações dos vírus gigantes para o ecossistema terrestre.

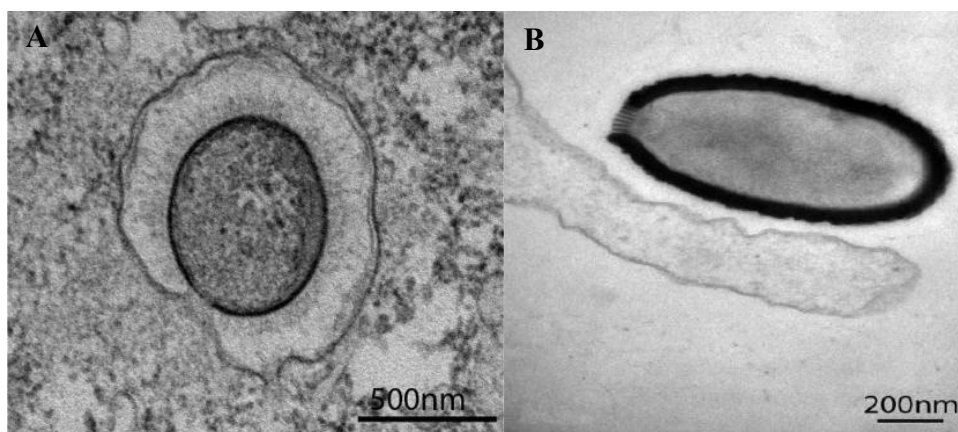


Figura 6. Imagem de dois vírus gigantes isolados de Permafrost siberiano. **A.** Microscopia eletrônica de *Mollivirus sibericum* com abertura de poro apical. Barra de escala 500nm. **B.** Microscopia eletrônica de *Pithovirus sibericum*. Barra de escala 200nm. Imagem adaptada de Abergel *et al.*, 2015.

1.3.1 Tupanvírus

O isolamento do Tupanvírus foi feito no Brasil, em Campos de Goytacazes, em sedimentos oceânicos a 3000m de profundidade (*Tupanvirus altamarinense*) e em lagoas do Pantanal de água de alta salinidade e alta alcalinidade (pH=9) (*Tupanvirus salinum*). Esse vírus é particularmente distinto por possuir uma cauda característica como podemos observar na **Figura 6-A**.

Esse vírus impressiona pelo seu conjunto robusto de genes associados à tradução, com até 70 RNAs transportadores (RNAt), 20 aminoacil RNAt sintetases (aaRS), 11 fatores para todas as etapas de tradução e maturação de RNA transportador e RNA mensageiro e modificação de proteínas do ribossomo, exemplificado na **Figura 7** (Abrahão *et al.*, 2018). A presença desses elementos sugere que esse vírus gigante possui potencialmente uma capacidade primordial e autônoma para sintetizar proteínas, o que é incomum entre os vírus. Essa característica o aproxima mais de organismos celulares, em termos de complexidade biológica, sendo importante para a compreensão da evolução viral e dos limites da virologia.

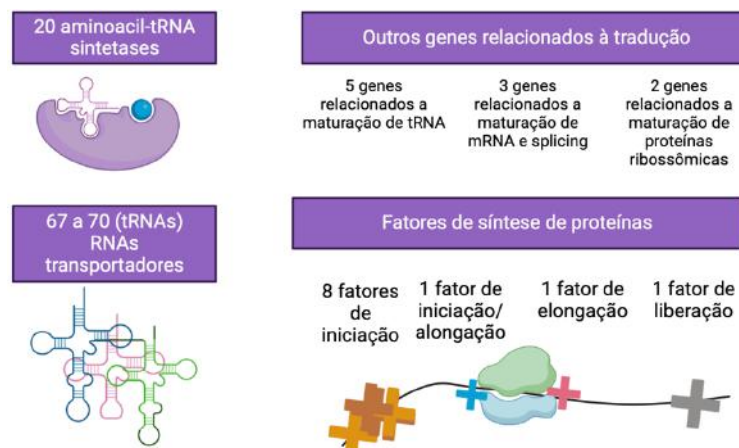


Figura 7. Esquema representativo de aparato transcricional do Tupanvírus. O Tupanvírus possui 20 aminoacil-tRNA sintetases, mais de 60 RNAs transportadores, genes relacionados à tradução e fatores de síntese de proteínas. Imagem adaptada de Abrahão *et al.*, 2018.

A constituição do Tupanvírus inclui um capsídeo pseudo-icosaédrico recoberto por fibrilas, acompanhado por uma cauda cilíndrica proeminente que se conecta à base do capsídeo. Curiosamente, essa cauda pode ser maior que o seu capsídeo, como ilustrado na **Figura 8-A**.

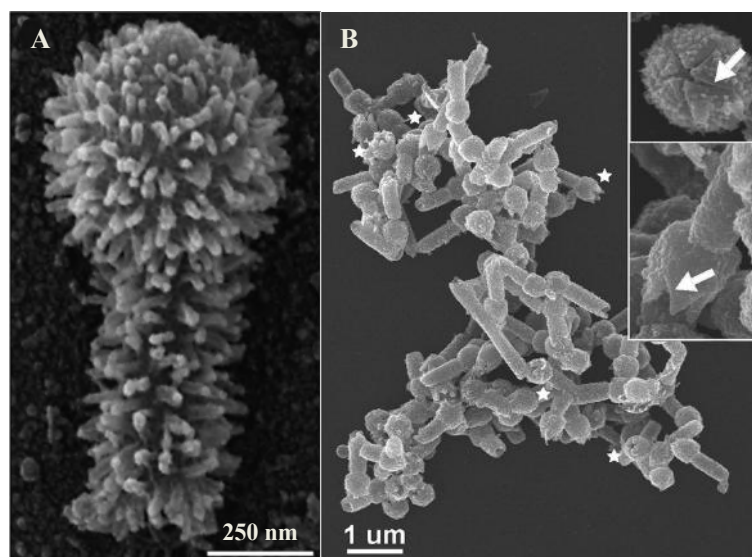


Figura 8. Microscopia da estrutura do Tupanvírus. **A.** Microscopia eletrônica de varredura de partícula do Tupanvírus. Tupanvírus é um vírus com cauda, capsídeo pseudo-icosaédrico e coberto de fibrilas. Imagem adaptada de Abrahão *et al.*, 2018. **B.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura do *stargate* e partículas de Tupanvírus. As setas indicam o *stargate* fechado e aberto da partícula do Tupanvírus. Imagem adaptada de Schrad *et al.*, 2020.

O ciclo de replicação do Tupanvírus, exemplificado na **Figura 9**, se inicia quando o vírus é fagocitado (I). Em seguida, o *stargate* se abre - uma estrutura específica do capsídeo que lembra uma estrela do mar de cinco pontas (podendo ser visto na **Figura 8-B**) - e as membranas internas do capsídeo se fundem ao fagossomo, que culmina na liberação do

conteúdo genômico (III), para que assim ocorra a liberação da semente viral e do genoma (IV). Essa semente é um complexo molecular integrado à vesículas que induz a saída de componentes virais, desencadeando a formação de fábricas virais (V). Nessa fábrica viral é onde ocorre massiva replicação de DNA e morfogênese de partículas. A finalização do ciclo ocorre com a lise celular e a liberação de progênie viral (VI). (Abrahão *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

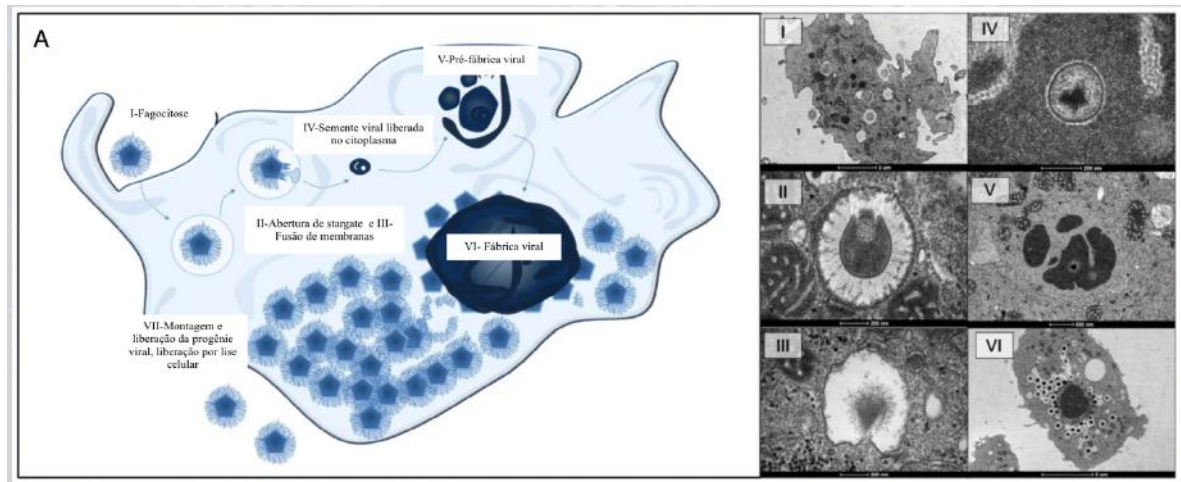


Figura 9. Representação de etapas ciclo replicativo de infecção de vírus gigantes em hospedeiro ameboide. Em A representação esquemática geral. **I-VI-** Microscopia eletrônica de transmissão de cada uma das etapas: **I-** Fagocitose; **II-** Abertura do Stargate; **III-** Fusão de membrana viral; **IV-** Liberação da semente viral no citoplasma da ameba e início da formação da pré-fábrica viral; **V-** Formação da fábrica viral propriamente dita e início da morfogênese de partículas; **VI-** Montagem e liberação da progênie viral, seguida de liberação das partículas por lise celular. Imagem adaptada de Abrahão *et al.*, 2014.

Durante ensaios de infecção com Tupanvírus em células de *A. castellanii*, foi comprovado que o *Tupanvírus salinum* pode ser citotóxico para a célula hospedeira, induzindo *shut down* de rRNA ribossômico, mecanismo desconhecido, apesar de ser tolerante à drogas inibidoras da tradução - geneticina e ciclohexamida (Abrahão *et al.*, 2018).

Em testes de permissividade pode-se constar que o Tupanvírus é distinto por possuir um amplo espectro de hospedeiros, sendo capaz de infectar e se multiplicar em diferentes espécies de *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Dyctiostelium* e *Willaertia*, com infecção produtiva e nas diferentes amebas citadas. Foi também possível detectar que esse vírus assumiu interações diferentes com outras espécies de *Achantamoeba*, por exemplo para *A. michelline* e *A. roryeba* um ciclo abortivo, em *Tricomonas tenax* foi observado uma interação refratária e em *Tetrahymena hyperangularis* desencadeou-se uma interação citotóxica diferente, sem multiplicação viral (Abrahão *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019). É proposto que a infecção do Tupanvírus em outras espécies é uma vantagem evolutiva que permite-lhe prosperar em um

ambiente aquático extremo (alta salinidade e profundidade). Consequentemente, nesses ambientes a baixa diversidade de espécies pode significar que os poucos organismos presentes têm menos concorrência por hospedeiros e isso aumenta as chances de um vírus conseguir infectar (Oliveira *et al.*, 2019).

1.4. *Acanthamoeba spp.*

A *Acanthamoeba spp.* é um protozoário de vida livre que está em diferentes ambientes, desde terrestres até marinhos. Possui duas formas evolutivas, a forma de trofozoíto, considerada a forma metabolicamente ativa e a forma de cisto - estado de latência, com baixa atividade metabólica (Bernard *et al.*, 2022).

Esses protistas já foram isolados de estojo, soluções e lente de contato, ambientes e materiais hospitalares, equipamentos de ventilação e parte do corpo como, por exemplo, em cavidades da face humana. Por ser hospedeira de patógenos microbianos, é capaz de veicular patógenos capazes de causar doenças em humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Niederkorn *et al.*, 1999; Chomiz *et al.*, 2010).

A *Acanthamoeba castellanii*, é a principal hospedeira descrita para vírus gigantes, inclusive para o Tupanvírus, objeto de estudo principal desse trabalho. Durante ensaios de infecção com o Tupanvírus, observa-se formação de efeitos citopáticos (CPE) de arredondamento e lise celular com a agregação de células infectadas a outras células não infectadas, com conformação similar a “cachos de uva”, visualizado na **Figura 10**. Isso pode estar relacionado com as chances das progênes virais de encontrarem seu hospedeiro em ambientes extremos mais facilmente, onde ocorre a escassez de célula hospedeira. Esse tipo de formação - de “cachos de uva” - é característico e único para o Tupanvírus, não tendo sido observado para outros vírus gigantes até então (Abrahão *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019).

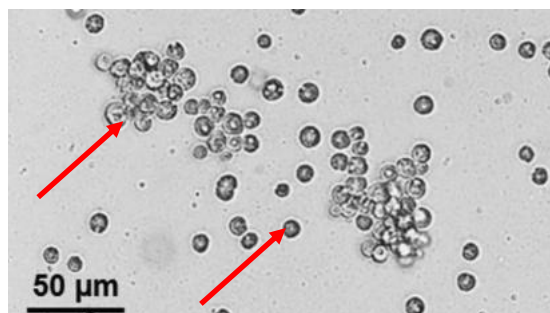


Figura 10. Efeito citopático em *A. castellanii*. Imagem de microscopia óptica do efeito citopático (CPE) sinalizado pelas setas em vermelho, característico de infecção por Tupanvírus em células de *A. castellanii*. Barra de escala em 50µm. Imagem adaptada de Rodrigues *et al.*, 2018

1.5 Cicloheximida

A cicloheximida (CHX), nome comercial do composto: B-[2-(3,5-dimetil-2-oxo-ciclohexil)-2-hidroxietil-]-glutamirida ou actidiona, é um composto isolado de *Streptomyces griseus*, que possui atividade antibacteriana, **Figura 11**. Esse composto age inibindo a síntese de proteínas através de ligação ao sítio de saída (sítio E) do ribossomo, de forma competitiva, bloqueando a translocação de tRNAs, retardando o ribossomo que traduz o RNA mensageiro (RNAm) e consequentemente impedindo a elongação (Kominek, 1975; Arenz *et al.*, 2016). É considerado tóxico para algas, protozoários, plantas e animais. Em *Acanthamoeba*, ensaios realizados demonstraram que a dose de 10 µM inibe a síntese de proteínas, impedindo a progressão do ciclo celular e, consequentemente, levando a redução da viabilidade celular (Rudick *et al.*, 1973; Chisholm *et. al.*, 1979; Paoletti *et al.*, 2010). Embora seja conhecido como inibidor de síntese de proteínas, o seu mecanismo preciso de ação em *Acanthamoeba spp.* ainda não foi completamente elucidado. Porém, estudo recente analisou que em célula infectada com *Mimivirus* e *Marseillevirus* por 8 e 24hpi, a droga estaria afetando a capacidade do vírus de causar os efeitos citopáticos, atrasando esses processos por aproximadamente 1 dia (Goyal *et al.*, 2022). Para Tupanvírus *salinum* foi observado em ensaio de infecção com *Acanthamoeba castellanii*, uma resistência aos inibidores de tradução, como a cicloheximida. Induz o *shut down* do RNA ribossômico na célula hospedeira, degradando-o (Abrahão *et al.*, 2018). Isso deveria tornar ribossomos não funcionais e interromper a síntese proteica. Logo, se o Tupanvírus está mantendo sua replicação viral, mesmo na presença dos inibidores de tradução, isso deixa implícito que o vírus possui uma forma alternativa de garantir a síntese de suas proteínas, ou possuam proteínas que impedem o efeito dessas drogas, dando continuidade para que ocorra a tradução. Porém esses processos ainda não foram elucidados.

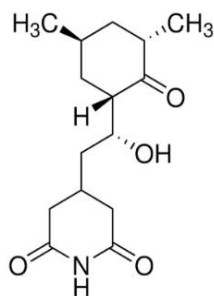


Figura 11. Fórmula molecular da cicloheximida. Inibidor de tradução que atua impedindo a etapa de translocação da síntese proteica em eucariotos. Imagem do site da Sigma-Aldrich. *Cycloheximide*. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/cycloheximide2813566819>. Acesso em: 28 de novembro de 2024.

2. JUSTIFICATIVA

O Tupanvírus tem um arsenal de genes relacionados à tradução de proteínas, além disso é capaz de induzir um efeito citopático peculiar em sua célula hospedeira, a *Acanthamoeba castellanii*. O mecanismo por trás disso e sua consequência não foram totalmente elucidados, especialmente no que diz respeito a influência desse processo para a replicação e síntese de proteínas. Com isso, é essencial investigar a complexidade da interação entre a ameba, o vírus e o agente inibidor da síntese proteica (CHX). Compreender essa interação, bem como os seus efeitos pode revelar mecanismos fundamentais da biologia do Tupanvírus, incluindo como esses vírus manipulam a maquinaria celular do hospedeiro para sua replicação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Testar a influência da cicloheximida, inibidor da síntese de proteínas, na maquinaria de síntese de proteínas de *Acanthamoeba castellanii* durante a infecção pelo Tupanvírus.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar a viabilidade celular em resposta a diferentes concentrações e tempos de exposição à cicloheximida
- 3.2.2. Analisar a infecção do Tupanvírus em células de *Acanthamoeba castellanii* tratadas com cicloheximida
- 3.2.3. Avaliar como o bloqueio da síntese de proteínas da célula *Acanthamoeba castellanii* influencia no processo replicativo do Tupanvírus, bem como a produção de proteínas virais e hospedeiras na presença e ausência do inibidor.

3.2.4. Avaliar a viabilidade das amebas *Acanthamoeba castellanii* ao longo do processo de infecção pelo Tupanvírus.

3.2.5. Monitorar as alterações na viabilidade celular em diferentes estágios da infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de célula

Os experimentos foram realizados utilizando *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30011). As células de linhagem de *Acanthamoeba castellanii* foram cultivadas em garrafas de 25 ou 75 cm² de área de cultura contendo meio PYG (20 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura e 18 g/L de glicose; 0,05 M de CaCl₂, 0,4 M de MgSO₄; 0,25 M Na₂HPO₄; 0,25 M KH₂PO₄; 1g de citrato de sódio; 0,005 M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂), pH=6,5, com adição de 200 µg/ml de penicilina/estreptomicina, 50 µg/mL de gentamicina. As culturas foram mantidas a 28 °C em estufa para crescimento de cultura até obtenção de crescimento confluyente. Para a quantificação das células utiliza-se câmara de Neubauer ao microscópio óptico, diluindo-se 10x em meio PYG. Após contagem, as células foram plaqueadas para os ensaios de infecção e para purificação de vírus gigantes.

4.2 Purificação de vírus

Para purificação de vírus foram utilizadas frasco de culturas de células de 75cm² (5x10⁶ células/mL). Em seguida foram adicionados vírus em multiplicidade de infecção (MOI) de 1. As células infectadas foram mantidas em estufa a 28 °C por 24 h, para constatar se houve a realização de efeito citopático. Em Tupanvírus é observável a formação de efeito citopático (CPE) similar a cachos de uva (Abrahão *et al.*,2018). A lise total da célula acontece em 48-72 horas após infecção. Em primeira etapa de centrifugação, o homogenato contendo vírus e *debris* celular é centrifugado a 3500xg por 10 min, onde o vírus fica no sobrenadante e é retirado para filtragem em filtros de 0,2µm, a fim de reter restos de células e outras impurezas. Este sobrenadante é sequencialmente adicionado a colchão de sacarose 22 % e centrifugado a 23,700xg por 30 min (rotor JA-20 Beckman). O *pellet* formado de vírus purificados é ressuspendido em 1 mL de PBS e armazenados em criotubos no freezer a -80 °C.

4.3 Teste com cicloheximida

Para avaliar o efeito da CHX na célula de *Acanthamoeba castellanii*, foram feitos testes de cicloheximida diluindo-se em meio PYG em diferentes concentrações: 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL. Em placa de 96 poços foram plaqueadas 4×10^4 células por poço. A análise de resultados foi feita em microscopia óptica em 24h, 48h e 72h. Posteriormente, para avaliar o efeito de inibição da droga na célula, foi feito o cultivo de células de *A. castellanii* em frascos de cultura (25 cm²) com 2×10^6 células em meio PYG. A célula ficou aderindo em estufa a 28°C por 1 h sem CO₂, retirando o meio após período de adesão. Posteriormente, foi adicionado o meio com a CHX nas concentrações onde observou-se resultados significativos do ensaio anterior que foram: 10 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL). Essas células ficaram incubadas em 24h e 48h. Em seguida foram retiradas as alíquotas para SDS-PAGE em 24h e 48h, das quais foram tratadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA), descrito com mais detalhes na sessão **4.5.2**.

4.4 Teste com cicloheximida em células infectadas

Para avaliar o efeito da CHX na célula de *Acanthamoeba castellanii* infectadas por TPV, foram feitos testes de CHX diluindo-se em meio PYG em diferentes concentrações 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL. Em placa de 96 poços foram plaqueadas 4×10^4 células por poço. Após 1h das células aderidas e tratadas em CHX, foi adicionado o vírus em multiplicidade de infecção 1. As células ficaram incubadas em meio PYG com CHX nas concentrações citadas em estufa a 28° durante 72h. A análise de efeito citotóxico da célula foi feita em microscopia óptica em 24h, 48h e 72h, as fotos foram tiradas com objetiva de 20x.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

4.5.1 Preparo de gel:

O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com Sambrook e Russell (2001). Para o gel de separação a 10% de Tris-glicina a 1,5M (pH=8,8). Para o gel de empilhamento, foi utilizada 5% de Tris-glicina a 1M (pH 6,8). A mistura para o gel de eletroforese foi realizada em sistema de Mini-Protean III dual slab cell (Bio-Rad Laboratories, Watford, Reino Unido), e os géis foram polimerizados em temperatura ambiente.

4.5.2. Preparo de amostras:

As amostras tratadas com CHX, 24h e 48h, foram lavadas e centrifugadas três vezes em 5mL em tampão fosfato salino (PBS) 1x à 1800xg por 5min. O pellet obtido foi ressuspensionado em 10% de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugado em microcentrífuga Eppendorff (Eppendorff AG, Hamburgo, Alemanha) a 12.400xg por 15 min para precipitação proteica. O pellet foi então lavado com 500µL de acetona e centrifugado em 12.400xg por 5 min, retirando completamente o sobrenadante e colocando o pellet para secar em estufa à 28°C sem CO₂. Posteriormente, foi adicionado 30µL tampão de amostra, que foi homogeneizado e aquecido em termociclador (AmphiTherm Thermal Cycler, Madison, EUA) à 95°C por 5 min.

4.5.3. Condições de corrida:

Em seguida, 15µL de amostras foram adicionadas no poço de gel de poliacrilamida, e a eletroforese foi realizada em aparelho Mini-Protean III dual slab cell (Bio-Rad Laboratories, Watford, Reino Unido) a 200V.

4.5.4 Fixação, coloração e descoloração:

Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 por 30min, seguido por lavagem em água destilada e incubação em solução descorante (10% de ácido acético; 30% de metanol) até visualização completa das bandas.

4.5.5 Digitalização de gel e realização de densitograma:

Após incubação o gel foi novamente lavado em água destilada e fotografado. A análise densitométrica foi feita utilizando *software* ImageJ e os gráficos por Excell.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos citotóxicos e inibitórios observados em células de *Acanthamoeba castellanii* tratadas com CHX

Ao avaliar a influência da CHX, droga inibidora da síntese de proteínas, em diferentes concentrações e tempo de exposição, percebe-se que o fármaco induziu mudanças morfológicas significativas em células de *Acanthamoeba castellanii* de maneira dependente da concentração. Na menor concentração observada, 10 µg/mL, não foram detectados efeitos de citotoxicidade aparentes na morfologia celular de *A. castellanii*. Assim como 25 µg/mL, as células recuperaram sua morfologia característica de trofozoíto dentro de 48 horas. Porém em concentrações mais altas, como 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, observou-se um efeito citotóxico caracterizado pelo arredondamento celular progressivo ao longo de 72 horas. Esses resultados estão detalhados na **Figura 12** e evidenciados no **Quadro 1**.

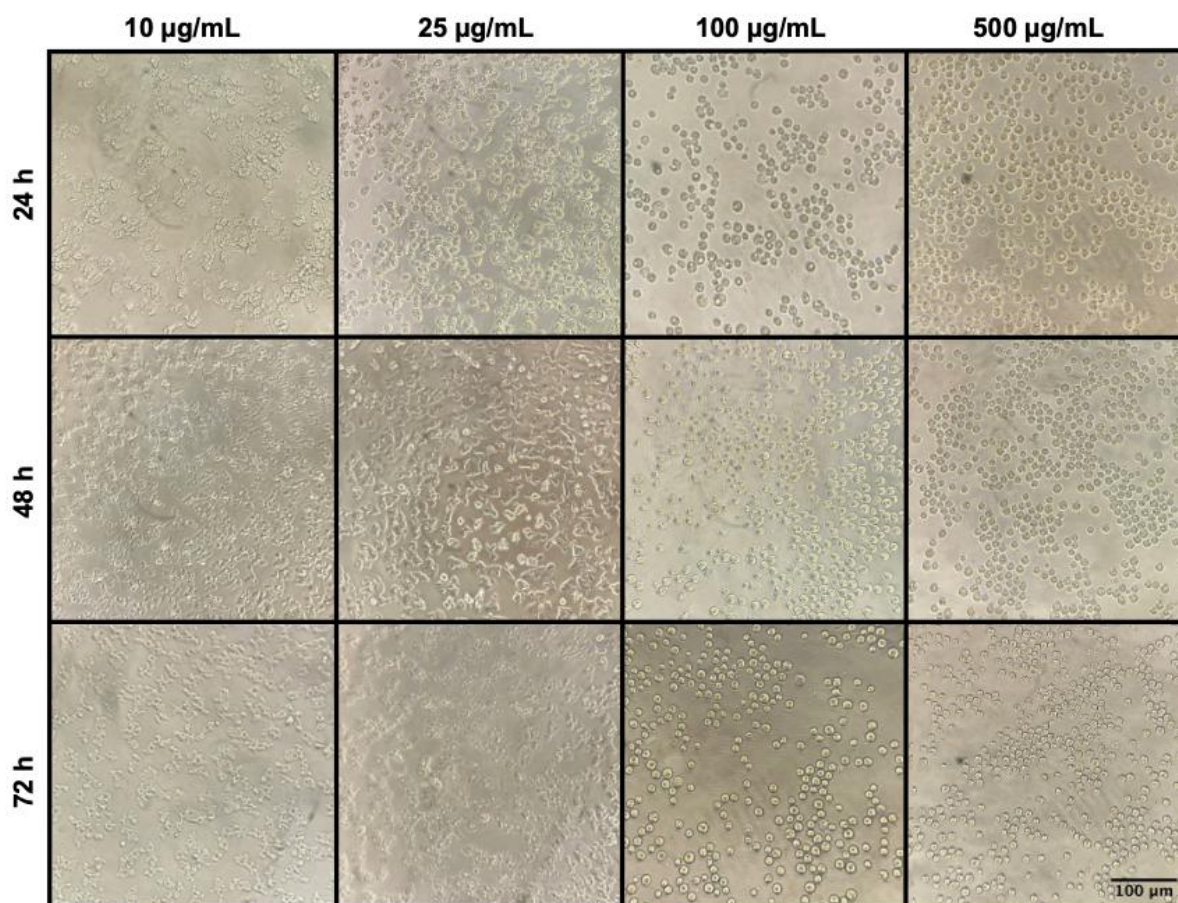


Figura 12. Análise morfológica em microscopia óptica de células tratadas com CHX em diferentes concentrações de 24h a 72hs. Células tratadas com cicloheximida nas concentrações de 10 µg/mL a célula não altera sua morfologia. Em 25 µg/mL é observado citotoxicidade com arredondamento das células em 24h, mas em 48h a célula retorna ao seu estado de trofozoíto. Em 100 µg/mL a 500 µg/mL, permanecem em estado de arredondamento durante período de 72h observado. Barra de escala 100µm, foto tirada com objetiva de 20x.

Quadro 1. Análise morfológica de células tratadas com CHX em diferentes concentrações de 24h a 72hs.

Horas [] CHX	24h	48h	72h
10µg/mL	Trofozoíto	Trofozoíto	Trofozoíto
25µg/mL	Aredondamento	Arredondamento+ Trofozoíto	Trofozoíto
50µg/mL	Aredondamento	Aredondamento	Arredondamento
100µg/mL	Aredondamento	Aredondamento	Arredondamento
250µg/mL	Aredondamento	Aredondamento	Arredondamento
500µg/mL	Aredondamento	Aredondamento	Arredondamento

A **Figura 13 (Apêndice A)** apresenta o perfil eletroforético de proteínas extraídas de células de *A. castellanii* tratadas com CHX em concentrações de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 500 µg/mL ao longo de 48 horas, analisadas por SDS-PAGE. Na concentração de 100 µg/mL,

observa-se uma redução moderada na intensidade das bandas proteicas, em destaque no quadro preto, ao longo do tempo, com várias bandas persistindo até as 48 horas, indicando uma inibição parcial da síntese proteica. Em 500 $\mu\text{g/mL}$, as bandas apresentam intensidade reduzida durante o período de incubação da droga. Na concentração mais baixa (10 $\mu\text{g/mL}$), as bandas estão significativamente mais parecidas com os respectivos controle de células.

As diferenças no padrão de bandas entre as concentrações poderiam indicar uma resposta dose-dependente à CHX, onde concentrações mais altas resultaram em maior redução na expressão total de proteínas. Além disso, a presença de algumas bandas residuais em concentrações menores pode sugerir a expressão de proteínas específicas menos suscetíveis à inibição pela CHX, ou a meia-vida da droga estar sendo reduzida nessas concentrações.

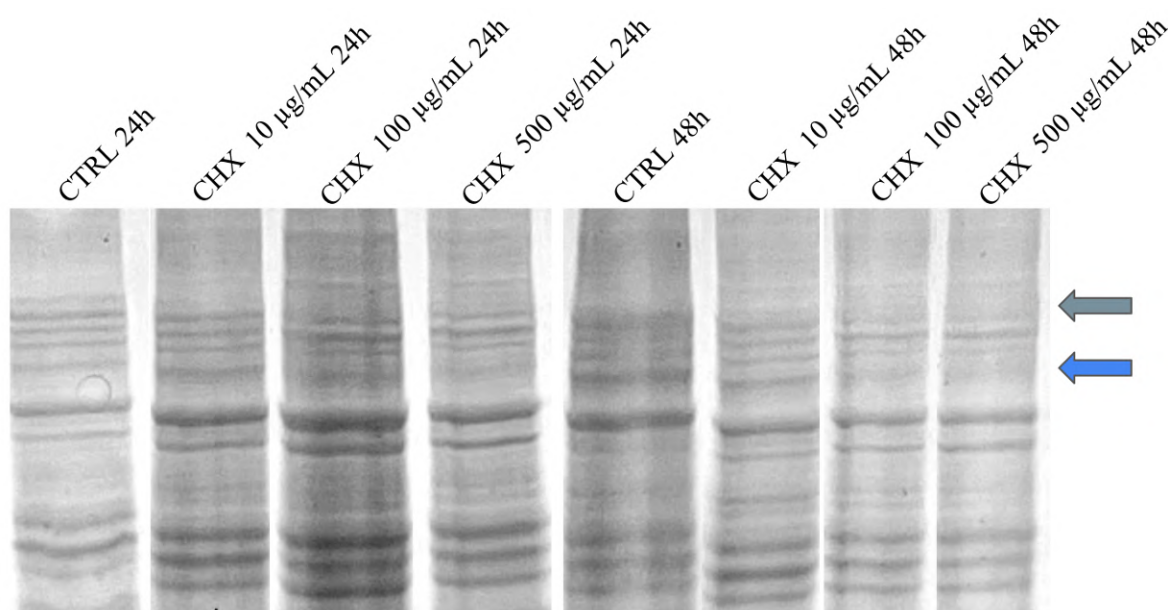


Figura 13. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de células de *A. castellanii* tratadas com CHX em até 48h. SDS-PAGE de células de *A. castellanii* tratadas com CHX nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ ao longo de 48h. As setas indicam ausência de bandas em comparação com o controle sem CHX em 24h.

O perfil observado corrobora a eficácia da CHX como inibidor da síntese de proteínas em *A. castellanii*, destacando também a possibilidade de efeitos residuais, por exemplo restos de proteínas do meio que podem estar associados à meia-vida da droga, ao genótipo da célula, ou à capacidade adaptativa do organismo ao longo do tempo.

A **Figura 14**, apresenta a porcentagem de expressão de proteínas em células de *Acanthamoeba castellanii* tratadas com cicloheximida (CHX) em concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ ao longo de 48 horas. Os valores foram obtidos por análise

densitométrica das bandas proteicas geradas por SDS-PAGE e quantificadas utilizando o *software* ImageJ.

Observa-se que na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a intensidade da expressão de bandas se manteve, com quase ausência de bandas densas observadas ao final do período analisado. Em 100 $\mu\text{g/mL}$, verificou-se um aumento significativa da expressão das bandas em 24 horas, porém ao observarmos 48h, ocorre uma redução da intensidade de bandas. Entretanto, em 500 $\mu\text{g/mL}$ de CHX, a intensidade das bandas reveladas pelo gel foi parcialmente reduzida ao longo do período de 48 horas, em comparação com as células controle.

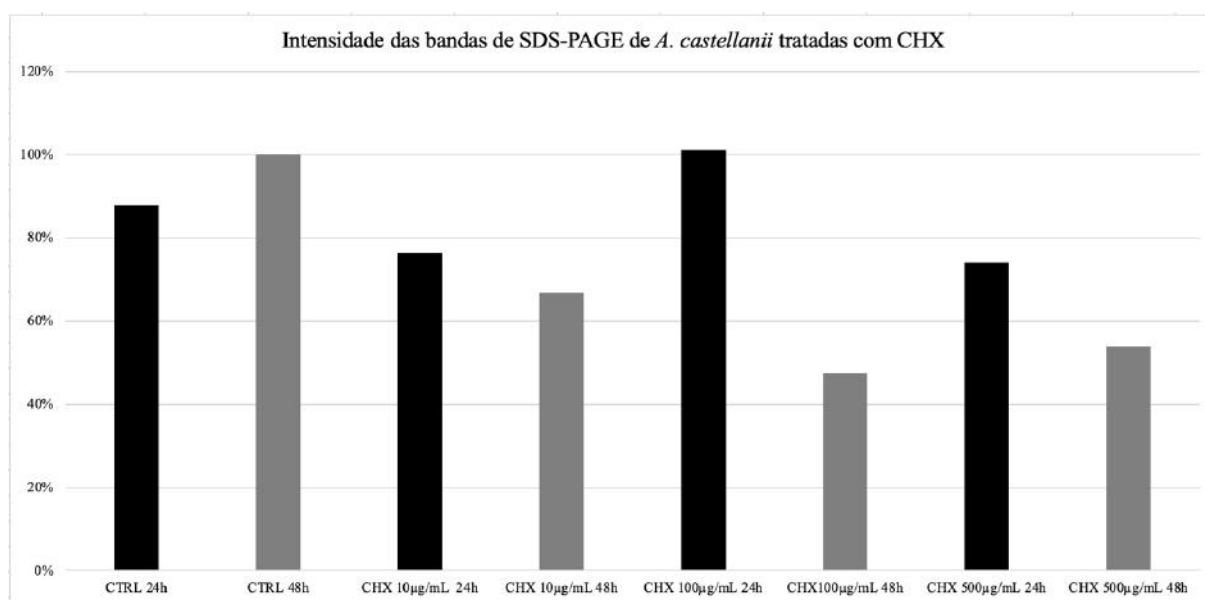


Figura 14. Análise densitométrica de SDS-PAGE de proteínas expressas em células de *A. castellanii* tratadas com CHX em diferentes concentrações ao longo de 48h. Análise feita com o *software* ImageJ de SDS-PAGE intensidade das bandas do gel nas células tratadas com CHX nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ ao longo de 48h. No eixo Y são percentagens obtidas por análise densitométrica.

Esses resultados sugerem um efeito inibitório da CHX na síntese de proteínas em *A. castellanii*. Com concentrações mais altas há maior redução da expressão de bandas, porém não há diferenças significativas quando tratamos a célula com concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ ou 500 $\mu\text{g/mL}$, como quando observamos o tratamento em 10 $\mu\text{g/mL}$, que parece não possuir efeito significativos na redução da expressão de bandas quando comparado com o controle. Além disso, a análise também indica que, em 48h de exposição a droga, esse efeito parece ser mais expressivo.

5.2 Análise de infecção de células de *A. castellanii* tratada com CHX

Os resultados obtidos com células tratadas com CHX demonstram uma relação dose-dependente na célula de *A. castellanii* infectada com Tupanvírus, conforme visto na **Figura 15** e descrito no **Quadro 2**. Nas células tratadas com 10 µg/mL de CHX e infectadas por Tupanvírus é possível observar, por microscopia óptica, a formação de efeito citopático (CPE) característico do vírus, com a conformação em "cachos de uva", já em 24 horas pós-infecção (hpi). Em concentrações ligeiramente mais altas, como 25 µg/mL, essa formação de CPE é notada apenas em 48 hpi, indicando um atraso no ciclo infeccioso.

Quadro 2. Ensaio de infecção de células tratadas com CHX em diferentes concentrações ao longo de 72h.

Horas	[] CHX	CPE
72h	-	Infecção em 24h
72h	10µg/mL	Infecção em 24h
72h	25µg/mL	Infecção após 48h
72h	50µg/mL	Não
72h	100µg/mL	Não
72h	250µg/mL	Não
72h	500µg/mL	Não

Entretanto, em concentrações superiores de CHX, como 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, não foi possível observar diretamente a ocorrência de infecção ou formação de CPE. Isso sugere que, nessas condições, a inibição da síntese proteica pela CHX pode ser suficientemente efetiva para bloquear ou atrasar significativamente o ciclo infeccioso do Tupanvírus.

Esses resultados indicam que a infecção pelo Tupanvírus é limitada em condições onde o efeito citotóxico da droga é maior, no caso nas concentrações mais altas de CHX. Contudo, a infecção observada em concentrações mais baixas (10 µg/mL e 25 µg/mL) sugere que o vírus pode possuir mecanismos que permitem certo grau de independência da maquinaria de tradução do hospedeiro, ou que as concentrações de CHX utilizadas nessas condições não foram suficientes para inibir completamente a síntese proteica. A confirmação dessas hipóteses requer análises adicionais para verificar a expressão de proteínas virais nesses cenários.

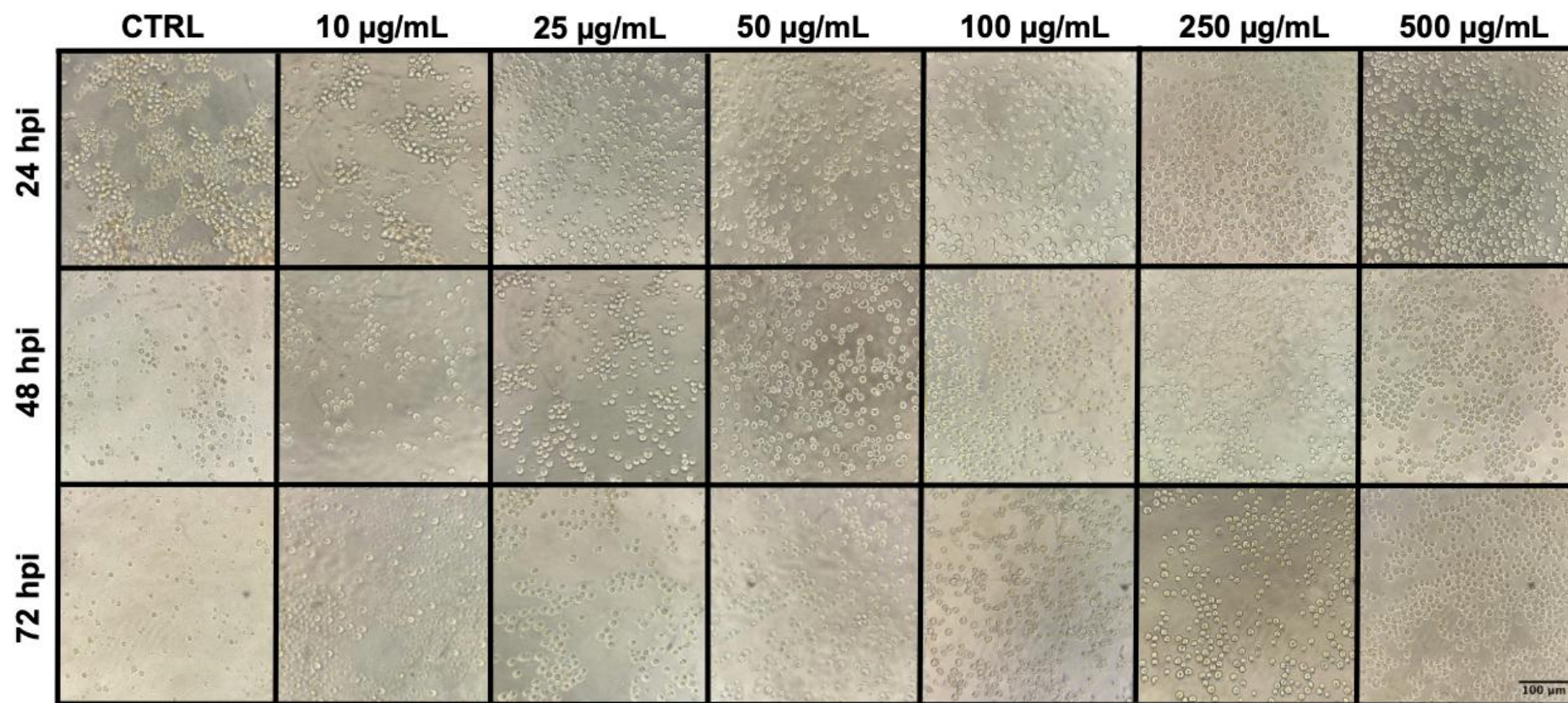


Figura 15. Ensaio de infecção por TPV em células tratadas com CHX. Células infectadas por TPV e tratadas com CHX nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ ao longo de 72h. No controle, a presença de CPE fica evidente em 24hpi, assim como em 10 $\mu\text{g/mL}$. Em 25 $\mu\text{g/mL}$ observa-se um atraso de 48hpi do CPE. Nas concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ não observa-se CPE durante período observado (**Quadro 2**). Barra de escala 100 μm , foto tirada com objetiva de 20x.

6. DISCUSSÃO

Abrahão e colaboradores (2018) apontam para a existência de componentes fundamentais do processo de tradução e codificação do genoma viral do Tupanvírus, além de observar que a infecção induz o *shut-down* de RNAr do hospedeiro. (Abrahão et al., 2014). Os resultados obtidos por essa monografia, poderiam corroborar para hipótese de que os vírus utilizem de elementos próprios para conduzir a tradução de suas proteínas durante processo de infecção do hospedeiro. Foi observado que mesmo nas concentrações de 10 e 25µg/mL, que não alteram morfologia celular, a célula é infectada pelo vírus, ainda que ocorra um atraso da infecção. Para melhor compreensão dessa questão, seria mais eficiente testar a influência da CHX durante o processo de infecção, adicionando concentrações diferentes da droga em um período onde ocorre a formação de fábrica viral e morfogênese de partículas, que seria entre 7 a 12 após a infecção.

A complexidade dos mecanismos pelos quais os vírus gigantes modulam a maquinaria celular do hospedeiro durante a infecção é uma questão ainda pouco compreendida e que necessita de maior exploração. Um desafio importante nesse contexto é a padronização do uso de fármacos inibidores da síntese de proteínas, como a cicloheximida, em ensaios experimentais. A falta de protocolos estabelecidos adequados dificulta a interpretação dos resultados.

Em pesquisa com Iridovírus (GSIV) pertencente ao grupo NCLDV, o grupo de Chen e colaboradores (2016) observaram que a CHX é capaz de bloquear a apoptose induzida por infecção pelo GSIV, aumentando a viabilidade celular em até 30%. Infecção pelo GSIV induz apoptose por meio de mecanismos mitocondriais com perda de potencial de membrana mitocondrial. Logo, a CHX depende de proteínas recém-sintetizadas para a ativação da apoptose, particularmente em cenários onde o vírus utiliza a maquinaria celular para programar a morte das células hospedeiras. (Chen et al., 2016). O teste de viabilidade celular seria importante para embasar os resultados obtidos por esse projeto ao analisar os efeitos da CHX na célula hospedeira e determinar se a redução na expressão de proteínas totais visualizadas por análise densitométrica de SDS-PAGE seria pela ação da droga de fato ou se ocorreu morte de células durante o processo de exposição ao fármaco.

Além disso, Goyal e colaboradores (2022) investigaram o impacto da CHX em dois vírus gigantes, Mimivírus e Marseillevirus, com o objetivo de compreender o processo de

infecção de cada um. Nos seus estudos, foi observado que, para o *Marseillevirus*, os efeitos iniciais da infecção são mediados por proteínas já pré-embaladas na cápside viral, as quais induzem efeitos citopáticos (CPE) mesmo na presença de CHX. Em contraste, o *Mimivírus* depende da síntese de proteínas virais para induzir o CPE e continuar o ciclo infeccioso (Goyal et al., 2022). No entanto, os ensaios realizados por Goyal e colaboradores (2022), usaram uma concentração de 30µM de CHX - que consideraram não tóxica para as células e que não interferia no crescimento celular - para incubar a célula por 15 minutos antes da infecção viral. Essa concentração corresponde a 8,44µg/mL, um valor consideravelmente inferior à concentração utilizada neste estudo de monografia.

Em nossos experimentos, a célula tratada com 10µg/mL de CHX, observada em período de até 72hs, manteve seu estado de trofozoíto, e a infecção ocorreu dentro do tempo esperado, com efeitos citopáticos visíveis após 24 horas. Essa diferença na concentração e no tempo de tratamento pode explicar as variações observadas nos resultados entre os estudos, destacando a necessidade de ajustes e uma maior padronização nos protocolos experimentais.

Vale ressaltar que, embora a cicloheximida seja um inibidor amplamente utilizado para bloquear a síntese de proteínas, seu uso pode trazer limitações e complicações. Santos e colaboradores (2019), realizaram experimentos com leveduras e observaram que, além de inibir a tradução, a CHX também interfere na transcrição gênica das células. Ao bloquear a síntese de proteínas, a droga causa alterações rápidas na transcrição, levando à produção de um novo conjunto de mRNAs que não são traduzidos em proteínas. Além disso, os pesquisadores destacam fatores como o genótipo da cepa de levedura utilizada e a escolha do solvente para diluir a droga como possíveis variáveis que podem afetar os resultados e complicar a interpretação dos dados experimentais.

Em nossos próprios resultados, obtidos nas análises de perfil eletroforético, **Figura 13**, e densitometria, **Figura 14**, observamos a presença de bandas nas amostras tratadas com CHX que não estavam presentes nas amostras controle. Esse fenômeno pode estar relacionado ao efeito observado por Santos e colaboradores (2019), sugerindo que a CHX pode estar interferindo na transcrição gênica, gerando mRNAs adicionais que não são traduzidos em proteínas, o que pode alterar a expressão de certas proteínas nas células tratadas. Para os casos dos experimentos realizados, também é importante considerar a escolha do solvente utilizado para diluição da droga e o tipo de cepa de *A. castellanii* (ATCC 30011) utilizada.

Novamente, essas diferenças podem refletir tanto a eficácia da CHX em bloquear a tradução ribossomal quanto em limitações técnicas que dificultam uma interpretação conclusiva. Fatores como a especificidade da inibição, veículo de diluição da droga e outras variáveis experimentais, como tempo de exposição e concentrações podem influenciar os resultados e precisam ser considerados ao interpretar os dados.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a cicloheximida exerce efeitos citotóxicos e inibitórios dependentes da concentração em *Acanthamoeba castellanii*, com impacto significativo na síntese de proteínas. Em concentrações mais baixas (10 µg/mL e 25 µg/mL) permitiram a manutenção da morfologia celular e recuperação das células tratadas. Porém nas mais altas de CHX (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL), observou-se um efeito citotóxico caracterizado pelo arredondamento celular progressivo ao longo de 72 horas. Esse efeito citotóxico foi acompanhado por uma redução da expressão de bandas em algumas amostras, observada no perfil eletroforético, especialmente nas concentrações mais altas de CHX.

No que se refere à infectividade do Tupanvírus em células tratadas com CHX, em concentrações de 10 µg/mL e 25 µg/mL de CHX, as células foram infectadas, gerando efeitos citopáticos (CPE) típicos para Tupanvírus, embora com um pequeno atraso no ciclo infeccioso. Em concentrações mais altas de CHX (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL), a infecção foi significativamente inibida, sugerindo que o efeito citotóxico da droga pode ter comprometido a realização do processo infeccioso.

Em resumo, os resultados obtidos propõem que o Tupanvírus, por ter um extenso aparato de tradução de proteínas. E para um melhor entendimento de seus mecanismos de replicação e da interação com o hospedeiro, são necessários mais estudos, especialmente no que se refere à análise da expressão de proteínas virais em diferentes cenários de tratamento com inibidores da síntese de proteínas, como a cicloheximida. É importante verificar o ensaio de viabilidade celular das células de *A. castellanii* tratadas com CHX, a fim de analisar se ocorreria o aumento da viabilidade celular ou redução, e verificar se, ao ser infectada pelo Tupanvírus, poderia ocorrer a reversão do quadro, haja vista que o Tupanvírus induz *shut down* de RNAríbssomal nos seus hospedeiros. Além disso, o tratamento com CHX nas células deve ser inserido em um momento de formação de fábrica viral e morfogênese de partículas, que seria

entre 7h à 12h após a infecção com o Tupanvírus, a fim de analisar melhor como a infecção estaria modulando a síntese de proteínas na célula hospedeira.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AbergeL, C.; Legendre, M. e Claverie, J. (2015). The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford, 39, 779-796.
2. Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C., Almeida, G. M., Boratto, P. V., Colson, P., La Scola, B., e Kroon, E. G. (2014). *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. *Virology journal*, 11, 120.
3. Arenz, S., e Wilson, D. N. (2016). Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development. *Molecular cell*, 61(1), 3–14.
4. Aherfi, S., Colson, P., La Scola, B., e Raoult, D. (2016). Giant Viruses of Amoebas: An Update. *Frontiers in microbiology*, 7, 349.
5. Artenstein A. W. (2012). The discovery of viruses: advancing science and medicine by challenging dogma. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 16, 470–473.
6. Artenstein, N.C., Artenstein, A.W. (2010). The Discovery of Viruses and the Evolution of Vaccinology. In: Artenstein, A., eds (*Vaccines: A Biography*. Springer, New York) NY, pp 141-158.
7. Aylward, F. O., Abrahão, J. S., Brussaard, C. P. D., Fischer, M. G., Moniruzzaman, M., Ogata, H., e Suttle, C. A. (2023). Taxonomic update for giant viruses in the order *Imitervirales* (phylum *Nucleocytoviricota*). *Archives of virology*, 168, 283.
8. Bos, L. (1999). Beijerinck's Work on Tobacco Mosaic Virus: Historical Context and Legacy. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 354, 1383, pp. 675–685.
9. Campos, R. K., Boratto, P. V., Assis, F. L., Aguiar, E. R., Silva, L. C., Albarnaz, J. D., Dornas, F. P., Trindade, G. S., Ferreira, P. P., Marques, J. T., Robert, C., Raoult, D., Kroon, E. G., La Scola, B., e Abrahão, J. S. (2014). Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virology journal*, 11, 95.
10. Chisholm, G. E., 4th, e Vaughan, M. H. (1979). Isolation and characterization of a cycloheximide-resistant mutant of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Journal of bacteriology*, 138, 280–283.
11. Colson, P., La Scola, B., Levasseur, A., Caetano-Anollés, G. e Raoult, D. (2017). Mimivirus: leading the way in the discovery of giant viruses of amoebae. *Nature reviews. Microbiology*, 15, 243–254
12. Fischer, M. G., Allen, M. J., Wilson, W. H. e Suttle, C. A. (2010). Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 45, 19508–19513.
13. Goyal, N., Barai, A., Sen, S., e Kondabagil, K. (2022). Amoebal Tubulin Cleavage Late during Infection Is a Characteristic Feature of *Mimivirus* but Not of *Marseillevirus*. *Microbiology spectrum*, 10, e0275322.
14. Kominek, L. A. (1975). Cycloheximide Production by *Streptomyces griseus*: Control Mechanisms of Cycloheximide Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, 7, 856.
15. La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J. M., e Raoult, D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science*, 299, 2033.
16. Legendre, M., Lartigue, A., Bertaux, L., Jeudy, S., Bartoli, J., Lescot, M., Alempic, J. M., Ramus, C., Bruley, C., Labadie, K., Shmakova, L., Rivkina, E., Couté, Y., Abergel, C., e Claverie, J. M. (2015). In-depth study of *Mollivirus sibericum*, a new 30,000-y-old giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E5327–E5335.
17. Panjwani N. (2010). Pathogenesis of *acanthamoeba keratitis*. *The ocular surface*, 8, 70–79.

18. Oliveira, G., Silva, L., Leão, T., Mougari, S., Fonseca, F. G., Kroon, E. G., La Scola, B. e Abrahão, J. S. (2019) Tupanvírus-infected amoebas are induced to aggregate with uninfected cells promoting viral dissemination. *Scientific Reports*, 9,183.
19. Paoletti, F., Ainger, K., Donati, I., Scardigli, R., Vetere, A., Cattaneo, A., e Campa, C. (2010). Novel fluorescent cycloheximide derivatives for the imaging of protein synthesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 258–264.
20. Rodrigues, R. A. L., Mougari, S., Colson, P., La Scola, B. e Abrahão, J. S. (2019). "Tupanvírus", a new genus in the family Mimiviridae. *Archives of virology*, 164, 325–331
21. Rudick, V. L. e A. W. R. (1973). Effects of Cyclohexamide on RNA Polymerase Specific Activity and Encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Nature*, 244, p. 220–222.
22. Schulz, F., Roux, S., Paez-Espino, D., Jungbluth, S., Walsh, D. A., Denef, V. J., McMahon, K. D., Konstantinidis, K. T., Eloë-Fadrosh, E. A., Kyrpides, N. C. e Woyke, T. (2020). Giant virus diversity and host interactions through global metagenomics. *Nature*, 578, 432–436
23. Silva, L. C. F., Rodrigues, R. A. L., Oliveira, G. P., Dornas, F. P., La Scola, B., Kroon, E. G. e Abrahão, J. S. (2019). Microscopic Analysis of the Tupanvírus Cycle in *Vermamoeba vermiformis*. *Frontiers in microbiology*, 10, 671.
24. Chantal, A., Legendre, M., Claverie, J.-M., (2015). The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus, *FEMS Microbiology Reviews*, 39 (6) , 779–796.
25. Xiao, C., Fischer, M.G., Bolotaulo, D.M., Rondeau, N. (2017). Cryo-EM reconstruction of the *Cafeteria roenbergensis* virus capsid suggests novel assembly pathway for giant viruses. *Scientific Reports*, 7, 5484.
26. Schrad, J. R.; Abrahão, J. S.; Cortines, J. R.; PAI, Kristin N.(2020). Structural and proteomic characterization of the initiation of giant virus infection. *Cell*, 181 (6), 5, 1046-1061.
27. Santos, A. D., Shi, L., P Tu, B., Weissman, J. S., (2019). Cycloheximide can distort measurements of mRNA levels and translation efficiency, *Nucleic Acids Research*. 47 (10) 4974–4985.
28. Wang, T., Hong, M. (2015). Investigation of the Curvature Induction and Membrane Localization of the Influenza Virus M2 Protein Using Static and Off-Magic-Angle Spinning Solid-State Nuclear Magnetic Resonance of Oriented Bicelles. *Biochemistry*. 54, 13, 2214-2226.
29. Del Arco, A., Fischer, M., Becks, L. (2022). Simultaneous Giant Virus and Virophage Quantification Using Droplet Digital PCR. *Viruses*, 14, 5, 1056, 2022.
30. Assis, F. L., Bajrai, L., Abrahao, J. S., Kroon, E. G., Dornas, F. P., Andrade, K. R., Boratto, P. V. M., Pilotto, M. R., Robert, C., Benamar, S., Scola, B. L., & Colson, P. (2015). Pan-Genome Analysis of Brazilian Lineage A Amoebal Mimiviruses. *Viruses*, 7(7), 3483-3499.
31. Fischer, M. G., Kelly, I., Foster, L. J., & Suttle, C. A. (2014). The virion of *Cafeteria roenbergensis* virus (CroV) contains a complex suite of proteins for transcription and DNA repair. *Virology*, 466–467, 82–94.
32. Philippe, N., Legendre, M., Dautre, G., Couté, Y., Poirot, O., Lescot, M., Arslan, D., Seltzer, V., Bertaux, L., Bruley, C., Garin, J., Claverie, J.-M., & Abergel, C. (2013). Pandoraviruses: Amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science*, 341(6143), 281-286.
33. Chomicz, L., Padzik, M., Graczyk, Z., Starosciak, B., Graczyk, T. K., Naprawska, A., Oledzka, G., & Szostakowska, B. (2010). *Acanthamoeba castellanii*: In vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Experimental Parasitology*, 126(1), 103-105.
34. Bernard, C., Locard-Paulet, M., Noël, C., & al., et. (2022). A time-resolved multi-omics atlas of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Nature Communications*, 13, 4104.

35. Santos, N. S. O., Romanos, M. T. V., & Wigg, M. D. (2015) *Virologia Humana*. 3 ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp. 76-77
36. Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (2017). *Medical Microbiology*. 25^a ed. (New York: McGraw-Hill Global Education), pp. 407-408
37. Mayer, A. (1886) Concerning the mosaic disease of tobacco. *Die Landwirtschaftliche Versuchsstationen*. 32:451–67.
38. Beijerinck, M. W. (1898). Concerning a *contagium vivum fluidum* as a cause of the spot-disease of tobacco leaves. *Verhandelingen der Koninklijke Akademie Wetenschappen te Amsterdam*, 65, 3–21.
39. Ivanowski, D. (1892). Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. *St. Petersburg Academy of Imperial Sciences Bulletin*, 35, 60–67.
40. Chen, X.-Y., Wen, C.-M., Wu, J.-L., Su, Y.-C., & Hong, J.-R. (2016). Giant seaperch iridovirus (GSIV) induces mitochondria-mediated cell death that is suppressed by congeneric acid and cycloheximide in a fish cell line. *Virus Research*, 213, 37-45.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Foto de SDS-PAGE sem edição e processamento de imagem.

