

VIRUS EM FUNGOS: UMA ÁREA EMERGENTE

VIRUS IN FUNGI: AN EMERGING AREA

MARCELO ALBERTO ELIAS^{1*}, CARLA CAROLINE BURGARDT¹

1. Biólogos e docentes da educação básica, técnica e profissional. Mestrandos do Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada – Universidade Estadual de Maringá.

* Rua santos Dumont 379, Zona 03 .Maringá- Paraná, Brasil. Cep: 87050-100 eliasmarceloalberto@hotmail.com

Recebido em 28/04/2014. Aceito para publicação em 15/05/2014

RESUMO

O estudo dos vírus tem se tornado cada vez mais emergente no campo das pesquisas biológicas, em especial suas relações com outros organismos, tais como, plantas, animais e até mesmo em fungos. Por esse motivo essa revisão atualizada sobre os vírus e em especial sua relação com os fungos pode servir como atualização sobre as pesquisas realizadas atualmente com vírus e fungos. Além dos aspectos básicos do vírus como estrutura e reprodução, as técnicas de identificação (eletroforese e microscopia de varredura) são bastante relevantes atualmente.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus, micovírus, eletroforese, microscopia de varredura.

ABSTRACT

The study of viruses has become more time in the emerging field of biological research, in particular its relationship with other organisms, such as plants, animals and even fungi. Therefore, this updated review about the virus and, in particular, its relationship with fungi can serve as an update on the research currently conducted with viruses and fungi. Besides the basic aspects of virus like structure and reproduction, the identification techniques (electrophoresis and microscopy) are quite relevant today. Viruses:

KEYWORDS: Mycovirus, electrophoresis, microscopy.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Van Regenmortel *et al* (2000)¹ a taxonomia universal dos vírus inequívoca (nomenclatura e classificação) é vital para distinguir os milhares de vírus que foram isoladas de humanos, animais, plantas, fungos, bactérias e arqueobactéria. Antes de uma identificação oficial e sistema de classificação foi criado, houve muita confusão e duplicação dos vírus isolados em diferentes laboratórios ao redor do mundo.

As primeiras tentativas organizadas internacionalmente para introduzir alguma ordem na desconcertante variedade de vírus, ocorreu no Congresso Internacional de Microbiologia realizada em Moscou em 1966. Uma comissão, mais tarde chamado o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), foi dada a tarefa de desenvolver um esquema taxonômico único, universal para todos os vírus. No sétimo relatório produzido pelo ICTV estão os dados taxonômicos acumulados de seus antecessores e os registros dos trabalhos da comissão desde 1995, incluindo decisões tomadas no X Congresso Internacional de Virologia realizado em Jerusalém em 1996, e em reuniões de médio prazo em 1997 e 1998¹.

A informação é essencial para qualquer pessoa que trabalhe no campo da virologia. Clínicos em laboratórios de diagnóstico, os pesquisadores citaram vírus em artigos publicados, e virologistas do setor empresarial todos devem ter a taxonomia de vírus mais atualizado para fazer as devidas referências¹.

O número de vírus reconhecidos continua a crescer com o desenvolvimento de melhores técnicas de detecção, e a rápida evolução das variantes do vírus. Principais Características. A referência oficial para a taxonomia e nomenclatura vírus. Contém 30 % nova taxa, incluindo duas novas importantes contribuições sobre as relações filogenéticas entre os vírus, e aplicação do conceito de espécies de vírus em todo o mundo vírus, compila informações 300-400 especialistas. Abrange mais de 4000 vírus reconhecidos, organizado pela família, com diagramas de organização do genoma e do ciclo de replicação do vírus onde se Inclui mais de 300 figuras e ilustrações¹.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente artigo constitui uma revisão atualizada sobre vírus e m fungos, realizada a partir da pesquisa bibliográfica em teses, dissertações, monografias,

artigos científicos, periódicos, livros, dentre outros meios de informação relevante para a pesquisa.

3. DESENVOLVIMENTO

Entendendo os vírus

Vírus são pequenos seres parasitas formados por uma cápsula proteica que podem infectar organismos vivos (seres humanos ou animais). O termo vem do Latim *virus* que significa veneno ou toxina.

Os vírus necessitam de células hospedeiras para se reproduzirem. Dentro das células conseguem obter aminoácidos, ribossomos e outras substâncias que possibilitam a multiplicação em milhares de novos vírus. Esse processo de replicação viral pode demorar apenas algumas horas ou vários dias, dependendo do vírus. Uma vez dentro das células, os vírus começam a interferir no normal funcionamento das mesmas e a provocar doenças diversas como: AIDS (através do HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana), HPV – Vírus do Papiloma Humano, Gripe (por exemplo através do vírus Influenza A subtipo H1N1), dentre outras. Para prevenção e combate de algumas doenças, existem as vacinas virais e outros medicamentos².

Os vírus têm sido agrupados ou classificados de várias maneiras. Um dos primeiros sistemas, que ainda tem uso limitado, estabelecia subgrupos de acordo com a espécie do hospedeiro normalmente infectado pelo vírus (animais, vegetais ou microrganismos). Outro método de classificação dos vírus se baseava-se na afinidade tissular dessas partículas infectantes, por exemplo, os vírus que se fixam às células nervosas eram denominados vírus neurotrópicos. À medida que se foi desenvolvendo a análise das características físicas, químicas e biológicas dos vírus, acumulou-se uma informação sobre a qual era possível construir uma classificação de acordo com esses conhecimentos².

Existem basicamente dois tipos de ciclos reprodutivos: o ciclo lítico e o ciclo lisogênico. Esses dois ciclos iniciam com o **fago T** aderindo à superfície da célula bacteriana através das fibras protéicas da cauda. Esta contrai-se, impelindo a parte central, tubular, para dentro da célula, à semelhança, de uma microseringa. O DNA do vírus é, então, injetado fora da célula a cápsula protéica vazia. A partir desse momento, começa a diferenciação entre ciclo lítico e ciclo lisogênico.

No **ciclo lítico**, o vírus invade a bactéria, onde as funções normais desta são interrompidas na presença de ácido nucléico do vírus (DNA ou RNA). Esse, ao mesmo tempo em que é replicado, comanda a síntese das proteínas que compõem o capsídeo. Os capsídeos organizam-se e envolvem as moléculas de ácido nucléico. São produzidos, então novos vírus. Ocorre a lise, ou seja, a célula infectada rompe-se e os novos bacteriófagos são liberados. Sintomas causados por um vírus que se re-

produz através desta maneira, em um organismo multicelular aparecem imediatamente. Nesse ciclo, os vírus utilizam o equipamento bioquímico (Ribossomo) da célula para fabricar sua proteína (Capsídeo).

No **ciclo lisogênico**, o vírus invade a bactéria ou a célula hospedeira, onde o DNA viral incorpora-se ao DNA da célula infectada. Isto é, o DNA viral torna-se parte do DNA da célula infectada. Uma vez infectada, a célula continua suas operações normais, como reprodução e ciclo celular. Durante o processo de divisão celular, o material genético da célula, juntamente com o material genético do vírus que foi incorporado, sofrem duplicação e em seguida são divididos equitativamente entre as células-filhas. Assim, uma vez infectada, uma célula começará a transmitir o vírus sempre que passar por mitose e todas as células estarão infectadas também. Sintomas causados por um vírus que se reproduz através desta maneira, em um organismo multicelular podem demorar a aparecer.

Ainda segundo Bossolon (2005)², antes que qualquer vírus possa infectar uma célula animal, ele primeiro deve ligar-se a um receptor específico na membrana celular, provavelmente uma glicoproteína. Como já foi dito, muitos vírus podem ter um envelope rico em lipídeo envolvendo o capsídeo. Do envelope de muitos vírus projetam-se "pontas" que podem conter glicoproteínas e lipídeos. As propriedades das moléculas que constituem o envelope estão relacionadas com a adesão do vírus à vários substratos. Se o envelope não está presente, as propriedades do capsídeo determinam as características adesivas do vírus.

A multiplicação dos vírus se faz por replicação, no qual as porções protéica e nucleica aumentam no interior das células hospedeiras sensíveis. Este processo pode ser dividido em etapas, que são comuns a todas as infecções virais:

1. Adsorção: envolve a participação de receptores específicos na superfície da célula hospedeira e das macromoléculas do vírion.

2. Penetração e desnudamento: os vírus com envelope unem-se às células hospedeiras, levando à fusão do envoltório lipoproteico dos vírus com a membrana citoplasmática da célula, que resulta na liberação do material núcleo capsídico no citoplasma celular. Os vírus nus (sem envelope) parecem penetrar pelo mecanismo de fagocitose.

3. Replicação bioquímica: a replicação ativa do ácido nucleico e a síntese de proteínas virais começam após a dissociação do capsídeo e do genoma. Além do ATP celular, os vírus requerem o uso dos ribossomos da célula, do RNA de transferência, de enzimas e de certos processos biossintéticos para sua replicação.

4. Acoplamento ou maturação: os vírus são capazes de dirigir a síntese dos componentes essenciais para sua progênie e de acoplar estes materiais sob a forma de

víriões maduros, no núcleo e/ou no citoplasma da célula infectada.

5. Liberação: este processo varia com o agente viral. Em alguns casos, a lise celular resulta na liberação concomitante das partículas virais. Em outros, a maturação e a liberação são relativamente lentas e os víriões são liberados sem a destruição da célula hospedeira.

Vírus em fungos

Os vírus foram descobertos em várias espécies de fungos, mas, ao contrário dos animais mais conhecidos ou vírus de plantas, eles são raramente associados com efeitos deletérios sobre os seus anfitriões. O conhecimento sobre o vírus entre fungos entomopatogênicos é muito limitada, embora sua existência é suspeita, devido à presença de vírus, como o RNA de cadeia dupla (dsRNA) em isolados de várias espécies³.

Segundo Moura & Powell (2007)⁴ associações entre vírus e fungos patogênicos têm sido estudadas e observadas em condições controladas e de campo. Os resultados demonstram a existência de interações que ocorrem basicamente de dois modos: o fungo atua como vetor do vírus ou plantas infectadas por vírus apresentam resistência maior a severidades de outras doenças.

Utilizando como exemplo a *Beauveria bassiana*, que é uma das espécies mais estudadas de fungos entomopatogênicos, que tem uma distribuição e é cosmopolita utilizado como agente de controle biológico de invertebrados em agricultura. Herreiro *et al.* (2012)⁵ analisaram uma coleção de 73 isolados obtidos em diferentes locais e de diferentes habitats em Portugal e Espanha, em busca de elementos indicativos de dsRNA de infecções virais. Os resultados mostraram que a prevalência de infecções virais é alta, 54,8% das amostras continham elementos de dsRNA com características virais. Os eletroferótipos dsRNA de isolados infectados indicaram que a diversidade de vírus foi alta na coleção analisada e que as infecções por vírus mistos ocorreram em isolados fúngicos. No entanto, numa experiência de hibridação indicou que as bandas que dsRNA são semelhantes em tamanho nem sempre têm seqüências similares. Espécies de vírus específicos ou perfis de dsRNA não foram associados com locais ou tipos de habitats, provavelmente por causa da ubiquidade e dispersão eficiente deste fungo como uma espécie ar. A seqüência de um dos elementos de dsRNA mais comuns correspondia à do genoma de 5,2 Kpb de um membro anteriormente descrito designado por *B. bassiana* um vírus de ARN (BbRV1).

Em outra aplicação diferente, Lima *et al.* (2012)⁶ aponta que vários autores têm investigado a influência de partículas virais de fungos. Genomas virais fúngicas são geralmente composto de ARNdc que são capazes de modular simbioses plantas fúngicos. As associações entre fungos e vírus seus anfitriões são semelhantes aos

envolvidos na planta – endófito interações. Mudanças nas características morfológicas e aumento da produção de conídios têm sido relatados como relacionado com a presença de ARNdc em *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, e *Nectria radicola*.

Lima *et al.* (2012)⁶ isolaram a partir de fungos endofíticos folhas de árvore medicinal chamada aroeira (*Schinus terebinthifolius*). Estes foram identificados por endófitos morfológica e métodos moleculares. Nós também ensaiadas à presença de partículas de dsRNA em *Colletotrichum* spp isolados.

Ainda nesse trabalho as árvores de pimenta brasileiros analisados foram colonizadas por três diferentes espécies de *Colletotrichum* e apresentou alta diversidade genética, incluindo a espécie *C. gloeosporioides* sentido lato, *C. boninense* e *C. simmondsii*. Os ecológicos papéis de endófitos são diversas e variadas. *Colletotrichum* complexo gloeosporioides é um patógeno de plantas em todo o mundo que infecta muitas espécies de plantas. Estes isolados vai precisar de mais exame para assegurar a identificação correta. Outro autor Zou *et al.* (2000)⁷ relatou endofíticos isolados de *C. gloeosporioides* a partir da haste de *Artemisia mongolica* que produziu o ácido colletotric, com atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, e *Helminthosporium sativum*.

Ao contrário dos vírus de plantas ou animais, que são comumente associados com a doença, muitos dos vírus fúngicas conhecidas não causar sintomas óbvios. Apenas alguns mycovirus são conhecidos por afetar seus hospedeiros, causando hipovirulência, doença ou sendo benéfica. Na verdade, uma associação mutualista entre mycoviruses endófitos, e seus hospedeiros vegetais, resultando em maior tolerância térmica planta, tem foi descrita recentemente por, Marquez *et al.* (2007)⁸. Mycovirus não recebeu tanta atenção quanto vírus de origem animal ou vegetal, mas numerosos vírus, fungos foram descritos desde o primeiro relatório de tal micovírus foi feita por Hollings em 1962. Muitos destes vírus tem RNA (dsRNA) genomas de fita dupla, mas espécies com ssRNA e dsDNA genomas também existir.

Os Mycovirus são comuns em todos os principais grupos de fungos fitopatogênicos. Eles são transmitidos durante a divisão celular intracelularmente, esporogênese, e a fusão celular, mas aparentemente não possuem uma via extracelular por infecção. Suas escalas de acolhimento naturais são limitados aos indivíduos dentro do mesmo ou intimamente relacionado grupos de compatibilidade vegetativa. Os recentes avanços, no entanto, permitiu o estabelecimento de faixas de acolhimento experimentais para algumas mycovirus. Embora a maioria dos mycovirus conhecidos têm dsRNA genomas que são empacotados em partículas isométricas, têm sido relatados um aumento do número de mycovirus geralmente com genomas de cadeia positiva. Discute-se

mycovirus selecionados que causam doenças debilitantes e ou reduzir a virulência de seus hospedeiros de fungos fitopatogênicos. Tais sistemas fúngicos-vírus são importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de controle biológico e para a obtenção de uma visão sobre a base molecular da virulência do fungo. A disponibilidade de seqüências genômicas virais e do hospedeiro e de transformação e transfecção protocolos para alguns fungos fitopatogênicos vai contribuir para o progresso de fungos virologia⁹.

Técnicas para detecção

Duas técnicas são bastante utilizadas nas pesquisas de "vírus de fungos": **ELETROFORESE DE DNA FUNGICO SE TRATAMENTO COM RNase e MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.**

Na primeira fragmentos de DNA e RNA podem ser separados de acordo com o seu tamanho através da eletroforese em gel de agarose. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica que pode ser utilizada para separar fragmentos de tamanhos diferentes quando colocados em um gel horizontal na presença de um campo elétrico. A agarose possui poros por onde as moléculas de DNA migram quando é adicionada uma corrente elétrica. A taxa de migração das moléculas é afetada pelo tamanho e forma das moléculas, densidade do gel e força da corrente elétrica. As moléculas maiores de DNA migram mais vagarosamente do que as moléculas menores. Quando o DNA é clivado com enzimas de restrição, fragmentos de diferentes tamanhos migram em diferentes padrões. O gel resultante apresenta um aspecto de "degraus de escada", visualizados após o gel ser corado com brometo de etídio, um corante que tem a propriedade de intercalar-se entre as fitas do DNA, emitindo radiação que pode ser identificada quando o gel é exposto a luz ultravioleta. Em um dos poços do gel, onde as amostras a serem avaliadas por eletroforese são colocadas, é adicionado um marcador de peso molecular contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido. Este tem como objetivo estimar o tamanho dos fragmentos gerados após a corrida. O tamanho de cada fragmento é medido em pares de bases (pb)¹⁰.

Na segunda, um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. Como resultado tem-se que os aparelhos modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas.

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia,

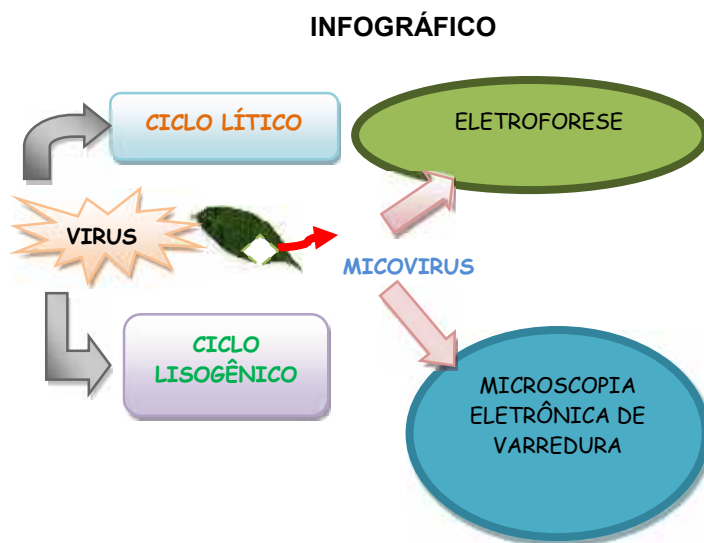
engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia.

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm¹¹.

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

4. CONCLUSÃO

Assim é possível observar que a área de estudos sobre "vírus em fungos" é bastante ampla e com uma gama de possibilidades de pesquisas e novas descobertas. Tecnologias avançadas como eletroforese de dna fungico se tratamento com RNase e microscopia eletrônica de varredura, podem contribuir para o avanço das pesquisas e novas descobertas.



REFERÊNCIAS

- [1] Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop D H L, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D. J, Pringle CR & Wickner RB. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

- [2] Bossolan NRS, Santos NFD, Moreno RDR, Beltrami LM. O centro de biotecnologia molecular estrutural: aplicação de recursos didáticos desenvolvidos junto ao ensino médio. *Cienc Cult.* 2005; 57:4.
- [3] Herrero N, Zabalgogazcoa I. Mycoviruses infecting the endophytic and entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* Virus. 2012; 160:409-13.
- [4] Moura, RM. Powell, NT. Estudos sobre o complexo TMV-M. incognita em tomate. *Soc Brasil Nematol.* 2007; 2.
- [5] Herrero N, Sánchez MS, Zabalgogazcoa I. 12 August Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants. *BioControl.* 2012. DOI: 10.1007/s10526-012-9476-9.
- [6] Lima H, Havens WM, Nibert ML, Ghabrial SA. 2011. RNA sequence determinants of a coupled termination-reinitiation strategy for downstream open reading frame translation in *Helminthosporium victoriae* virus 190S and other victoriviruses (family *Totiviridae*). *J Virol.* 2012; 85:7343-52.
- [7] Zou JC, Meng HLU, *et al.*, "Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia monogolica*," *J of Natural Products.* 2000; 63(11):1529-30.
- [8] Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science.* 2007; 315:513-5.
- [9] Ghabrial SA, Suzuki N. In Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (ed), *Desk encyclopedia of plant and fungal virology.* Elsevier, Oxford, United Kingdom. Fungal viruses. 2010; 517-24.
- [10] Watson S, McCauley E. Contrasting patterns of net- and nanoplankton production and biomass among lakes. *Can. J. Fish Aquat Sci.* 1992. 45: 915-920. Ghabrial SA. In Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (ed), *Desk encyclopedia of plant and fungal virology.* Elsevier, Oxford, United Kingdom. 2010; 500-9.
- [11] Nagatani T, Saito S, Sato M, Yamada M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. *Scanning Microscopy.* 1987; 11:901-9.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- [1] Ghabrial SA. In Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (ed), *Desk encyclopedia of plant and fungal virology.* Elsevier, Oxford, United Kingdom. 2010; 565-76.
- [2] Ghabrial SA, Nibert ML. *Victorivirus*, a new genus of fungal viruses in the family *Totiviridae*. *Arch Virol.* 2009; 154:373-9.
- [3] Herrera T, Ulloa M. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Univ Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, México. 1990; 552.
- [4] Herrero N, Sánchez MS, Zabalgogazcoa I. Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Arch Virol.* 2012; 154:327-30.
- [5] TORTORA *et al.* *Microbiologia.* Artmed, São Paulo, 10ª. edição. 2012.

