

ORLANDO CHIARELLI NETO

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO PORCINE CIRCOVIRUS 2
(PCV2), CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
ADENOVÍRUS RECOMBINANTE QUE EXPRESSA A
PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO PCV2

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2009

ORLANDO CHIARELLI NETO

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO PORCINE CIRCOVIRUS 2
(PCV2), CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
ADENOVÍRUS RECOMBINANTE QUE EXPRESSA A PROTEÍNA
DO CAPSÍDEO DO PCV2

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2009

Prof. Dr Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)

Prof^a Dr^a Juliana Lopes Rangel Fietto
(Co-orientador)

Prof. Dr. Leandro Licursi de Oliveira

Prof^a.Dr^a Denise Mara Soares Bazzolli

Prof^a.Dr^a Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

Aos meus pais, Nilson Chiarelli e Rosa Maria Sperandio Chiarelli.
Poderia dizer tantas palavras, mas é a lembrança do cafezinho feito no fogão a lenha que eles faziam às cinco da manhã quando eu saía para a escola.

Obrigado meus queridos, amo vocês!

Aos meus irmãos: Apesar de sermos tão diferentes fisicamente, temos um só coração que nos une sempre.

Aos meus avós que nunca sabiam como era meu trabalho, sempre acreditaram que estudar é nobre.

À Lu

Pessoa ímpar em minha vida que sempre me fez acreditar que tudo é possível.

Amo você!

À Márcia Rogéria

Chefe, orientadora, professora, mãe. Dispensa comentários, é melhor o coração sentir e se expressar no olhar

Obrigado por tudo, minha eterna professora!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o privilégio da vida.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ao Departamento de Nutrição, ao Departamento de Veterinária e ao Bioagro pelas condições de trabalho.

Ao serviço de transporte da UFV pela oportunidade de transporte para realização de experimentos na UFMG.

À Prof^a Juliana Fietto pela seriedade na geração do conhecimento.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo compromisso com o ensino.

Ao Prof. Murilo Zerbini pela co-orientação e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Joaquin Patarroyo pela sapiência e criticidade em suas orientações.

Ao Prof Leandro pela paciência e disposição em me ajudar nos experimentos.

Ao Prof Sérgio de Paula por disponibilizar o Laboratório de Immunovirologia.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Veterinária pela colaboração.

Ao Abelardo pela amizade e companheirismo nos trabalhos.

Ao Pedro pela colaboração computacional no capítulo de filogenia e filogeografia.

À Luciana, meu amor, que sempre acreditou em mim na alegria e na tristeza, nas aflições e nas conquistas.

Aos técnicos, Marquinhos e Sr. Valdir, que sempre me apoiaram nos momentos que precisei.

Aos meus amigos do LIMA que se foram, Luiza, Giu, Luciana, e aos que ficaram, obrigado pela boa convivência e apoio nos momentos de aperto.

Aos meus amigos veterinários, Gustavo, Mari e Luciana, pela força na reta final

Aos camundongos que foram eutanasiados para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Evolução molecular de suínos e vírus	3
2.2. Caracterização do circovírus suíno 2 (PCV2).....	4
2.3. Replicação viral.....	5
2.4. Infecção e transmissão do vírus	6
2.5. Aspectos clínicos e patológicos da circovirose suína	7
2.6. Controle e prevenção da circovirose suína.....	8
2.7. Resposta imune.....	9
2.8. Adenovírus como veículo de expressão em mamíferos.....	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 1	14
RESUMO.....	15

ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Isolamento do PCV2.....	19
2.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento da ORF2	21
2.3. Análises das seqüências de nucleotídeos.....	22
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	28
5. AGRADECIMENTOS	31
6. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. METODOLOGIA.....	40
2.1. Vírus e células.....	40
2.2. Amplificação da ORF2, clonagem e sequenciamento.....	40
2.3. Minipreparação de DNA plasmidial	41
2.4. Digestão com enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais.....	42
2.5. Construção dos vetores de adenovírus recombinantes.....	43
2.6. Transfecção das células HEK 293 com o DNA viral recombinante	44

2.7.	Verificação da replicação viral por <i>Western blotting</i>	44
2.8.	Ensaio da imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA).....	45
2.9.	Purificação de adenovírus recombinantes e titulação das progênes.....	46
2.10.	Imunofluorescência da proteína expressa pelos adenovírus purificado	47
2.11.	Imunização dos camundongos e avaliação da resposta imunológica.....	48
2.12.	Ensaio de linfoproliferação celular	49
2.13.	Avaliação da transcrição das citocinas IL-4 e INF- γ	49
2.14.	Avaliação de marcadores de superfície por citometria de fluxo.....	50
2.15.	Avaliação da resposta humoral por ELISA indireto.....	51
2.16.	Análises estatísticas	52
3.	RESULTADOS	53
3.1.	Construção do adenovírus recombinante	53
3.2.	Transfecção em células HEK 293	57
3.3.	Expressão da proteína <i>in vitro</i>	58
3.4.	Avaliação da expressão da proteína do capsídeo em células HEK 293 transfectadas com adenovírus recombinante purificado	59
3.5.	Avaliação do potencial imunogênico do candidato vacinal em animais	60
3.6.	Dosagem de citocinas	61
3.7.	Citometria de fluxo (FACS).....	62
3.8.	Resposta humoral.....	65
4.	DISCUSSÃO	67
5.	CONCLUSÕES GERAIS	71
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXO 1	88
APÊNDICE 1	89

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: O mapa mostra os locais de coleta de isolados de PCV2..	20
Figura 2: Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana dos 93 haplótipos da ORF2-PCV2.	24
Figura 3: Rede de haplótipos do subgrupo 1AB construída pelo aplicativo Network v 4.2.0.1.	25
Figura 4: Rede de haplótipos do grupo 2 construída pelo aplicativo Network v 4.2.0.1.	26
Figura 5: Ampliação da rede de haplótipos brasileiros encontrados no subgrupo 1AB.....	27

CAPÍTULO 2

Figura 1: Mapa físico do vetor pGEM-T Easy e vetor pAd5-Blue	42
Figura 2: Mapa físico do vetor pAd5-Blue ORF2. Vetor pAd5-Blue de 37 kb com a ORF2 do PCV2 utilizada para expressão do proteína do capsídeo do PCV2.	44
Figura 3: Isolamento da ORF2 pela PCR convencional.....	53
Figura 4: Ensaio de restrição do pGEM-ORF2. Clivagem do plasmídeo pGEM-ORF2 pela enzima de restrição <i>EcoRI</i>	54
Figura 5: Ensaio de restrição dos DNAs plasmidiais	55
Figura 6: Mapa físico do vetor pAd5-Blue ORF2.....	56
Figura 7: Confirmação da clonagem do fragmento de 720 pb no vetor pAd5-Blue. Clivagem dos vetores de adenovírus pela enzima <i>HindIII</i>	56
Figura 8: Expressão da proteína do capsídeo do PCV2 por <i>Western blotting</i> em células HEK 293 infectadas com os adenovírus recombinantes.....	58
Figura 9: Ensaio de imunoperoxidase em monocamada (IPMA).	59
Figura 10: Imunofluorescência de células HEK 293 infectadas com adenovírus recombinante purificado.....	60
Figura 11: Linfoproliferação das células esplênicas dos camundongos imunizados	61
Figura 12: Citometria de fluxo das células esplênicas dos camundongos imunizados.	63
Figura 13: Representação gráfica da população de células de memória.....	64
Figura 14: Cinética de produção de anticorpos dos soros coletados nos intervalos entre cada inoculação.	65
Figura 15: Reação de <i>Western blotting</i> utilizando soro dos camundongos vacinados.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Quantificação relativa das citocinas pela PCR em tempo real.	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- μF – Micro Faraday (10^{-6} F)
- ADN-Cap – Adenovírus recombinante
- APC - Antigen presenting cells
- BSA - Albumina do soro bovino
- Cap – Proteína do capsídeo
- CAR - Receptor celular de adenovírus
- cDNA – DNA complementar
- CH_3COOK – Acetato de potássio
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- ConA – Concanavalina A
- Ct - *threshold cycle*
- DAB - Tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*
- DTT – Ditioneitol: uma pequena molécula redutora com fórmula $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$
- EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid.*
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*
- FITC - Fluorescein Isothiocyanate
- g - Unidade de força centrífuga relativa
- HEK 293 - *Human embryonic kidney 293*
- IFA - Imunofluorescência
- Ig – Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- $\text{INF-}\gamma$ – Interferon gama
- IPMA - Immunoperoxidase Monolayer Assay
- IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
- LB – Meio de cultura *Luria-Bertani broth*
- M13 – Bacteriófago filamentoso composto de um DNA circular de fita simples
- Meio RPMI - É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular.
- MEM - Meio essencial mínimo
- MHC – *Major histocompatibility complex*
- MTT - Brometo tiazolil azul de tetrazólio
- NUPEB - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
- O.P.D. - o – fenildiaminobenzeno

- ORF – Fase de leitura aberta
- pb – Pares de bases
- PBL - Linfócitos periféricos do sangue
- PBS - Phosphate buffered saline
- PCR – Polymerase Chain Reaction
- PCV – Porcine circovirus
- PCVAD - Doenças associadas ao circovírus suíno
- PDNS - Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome
- PK15 - *Pig kidney cells*
- PMWS - Postweaning multisystemic wasting syndrome
- PNP - Pneumonia necrotizante e proliferativa
- rADN-Cap – Adenovírus recombinante que expressa a proteína do capsídeo do PCV2
- Rep – Proteína de replicação
- RF dsDNA: Forma replicativa de DNA fita dupla
- SDS – Surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio, em inglês: *Sodium dodecyl sulfate*
- SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
- SFB – Soro fetal bovino
- shRNA – *Small hairpin RNA*
- SK6 - Swine kidney cells
- SPF - Specific Pathogen Free
- TBS-T - *Tris-Buffered Saline Tween-20*
- TCID₅₀ - *Median Tissue Culture Infective d.*, Quantidade de microorganismos (vírus) que produzirá um efeito citopático em 50% da cultura inoculada
- TE – Tampão Tris-. 10 mM; EDTA 1 mM
- TNF – *Tumor necrosis factor*
- Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
- wt - *Wild Type*
- X-Gal - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside*

RESUMO

CHIARELLI NETO, Orlando, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Filogenia e filogeografia do porcine circovirus 2 (PCV2), construção e caracterização de um adenovírus recombinante que expressa a proteína do capsídeo do PCV2.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O circovirus suíno 2 (PCV2) é o principal agente causador da síndrome da postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) e está associado a diferentes síndromes em suínos. O genoma do PCV2 possui três ORFs principais, sendo a ORF2 a codificadora da proteína do capsídeo. No primeiro estudo, sequências de nucleotídeos da ORF2 de 30 isolados brasileiros foram analisadas e comparadas com outras sequências depositadas no GenBank usando uma abordagem filogenética e filogeográfica. No segundo estudo, a fim de controlar a circovirose suína, nós construímos um sistema de expressão gênica da ORF2 do PCV2 em vetor adenovírus. Primeiramente, um total de onze amostras de seis estados brasileiros foram coletadas e as ORF2 foram clonadas em vetor pGEM T-easy e sequenciadas. Nossos resultados, portanto, mostraram uma alta variabilidade de sequências no Brasil além de os isolados brasileiros serem classificados nos subgrupos 1AB, 2D e 2, e que o vírus foi introduzido no Brasil mais que uma vez. Em seguida, a ORF2 de um desses isolados foi amplificada pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e clonada em vetor pGEM T-easy. Células de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas com o plasmídeo recombinante (pGEM-ORF2) e o material genético amplificado. A clonagem foi confirmada por sequenciamento e ensaio de restrição com a enzima *EcoRI*. Confirmada a clonagem, o plasmídeo foi clivado pelas enzimas *AclI* e *NheI*, liberando a ORF2. Este segmento foi clonado no vetor pAD5-Blue previamente clivado pelas enzimas *ClaI* e *XbaI*. Células de *E. coli* TOP10 foram transformadas com a construção (pAd5-Blue ORF2); as colônias recombinantes foram selecionadas e o material genético multiplicado. Este plasmídeo foi linearizado pela enzima *PacI* e transfectado em células da linhagem HEK 293. A expressão viral *in vitro* foi confirmada por imunoperoxidase em monocamada, *Western blotting* e imunofluorescência. Os vírus purificados foram titulados em 2×10^8 TCID₅₀/50 μ L. Duas doses de vírus purificado foram inoculadas em camundongos BALB/c para verificação da resposta imune. Soro e baço dos animais foram coletados para ensaios de resposta humoral e celular, respectivamente. A resposta imune celular se caracterizou por uma eficiente expressão de mRNA de INF- γ bem como a proliferação de linfócitos T CD8⁺. Em relação à resposta humoral, o candidato vacinal apresentou produção de anticorpos principalmente após a segunda dose evidenciado na coleta de soro do dia 45. De acordo com os resultados

encontrados neste trabalho, acredita-se que este modelo de vacina possa ser utilizado em suíno SPF e convencional uma vez que em modelo murino, o adenovírus recombinante foi capaz de estimular resposta imune celular, em especial linfócitos T CD8⁺, o que destaca eficiência na eliminação do PCV2.

ABSTRACT

CHIARELLI NETO, Orlando, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Filogeny and filogeography of porcine circovirus 2 (PCV2), construction and characterization of a recombinant adenovirus that express capsid protein of PCV2.** Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Advisor: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Juliana Lopes Rangel Fietto.

The porcine circovirus 2 (PCV2) is the main agent causing the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and is associated with different syndromes in pigs. The genome of PCV2 has three major ORFs, the ORF2 encodes a protein of capsid. First in this study, the ORF2 nucleotide sequences of 30 Brazilian isolates were analyzed and compared to other GenBank sequences using phylogenetic and phylogeographic approaches. Second, in order for the control of swine circovirose, our constructed a system of gene expression of the ORF2 of PCV2 in an adenovirus vector. The first work, a total of eleven samples of six Brazilian states were collected and the ORF2 were cloned into vector pGEM T-easy and sequencing. Our results show high sequence variability in Brazil, since, in this work, the Brazilian isolates were classified into subgroup 1AB, 2D and 2, which reveals that the virus was introduced in Brazil more than once. The second work, one this isolate of ORF2 was amplified by the polymerase chain reaction (PCR). Cells of *Escherichia coli* DH5 α were transformed with the recombinant plasmid (pGEM-ORF2) and amplified genetic product. The cloning was confirmed by and a test of the restriction enzyme *EcoRI*. Confirmed the cloning, the plasmid was cleaved by restriction enzyme *NheI* and *AclI*, releasing the ORF2. This segment was cloned in the vector-Blue pAD5 previously cleaved with the enzymes *XbaI* and *ClaI*. Cells of *E. coli* TOP10 were transformed with the construction (pAd5 Blue-ORF2), the recombinant colonies were selected and the genetic product multiplied. This plasmid was cleaved by the enzyme *PacI*, linearized and transfectated in HEK 293 cells. The confirmation of viral expression *in vitro* was detected by Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA), *Western Blotting* and Immunofluorescence Assay (IFA) tecnicas. The purified viruses were tited in 2×10^8 TCID₅₀/50 μ L. Two doses of purified virus were inoculated into BALB/c animals to check the immune response. Serum and spleen of animals were collected for testing the humoral and cellular response respectively. The cellular immune response marked a high expression of mRNA for INF- γ and high proliferation of CD8⁺ T cells. Regarding the humoral response, the candidate vaccine showed antibody production after the second dose mainly evidenced in the collected of serum of day 45. According to the results found in this work, this type of vaccine can be used in SPF and convercional pigs since in mouse model,

the recombinant adenovirus was able to stimulate cellular immune response, particularly cells T CD8⁺, that emphasizes the elimination of PCV2.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da suinocultura industrial apresenta uma intensificação no trânsito de animais e produtos entre os países, possibilitando o aumento da disseminação de doenças consideradas endêmicas. Apesar de o Brasil ser um grande exportador de carne suína, perdas produtivas acumuladas na suinocultura, principalmente a partir da década de 90, tornaram os agentes infecciosos de suínos alvo de grande atenção (Zanela e Mores et al., 2003).

Duas espécies de circovírus suínos foram caracterizadas. O Porcine circovirus 1 (PCV1) foi descrito inicialmente como um agente infectante de células de rim de porco (PK15) e não apresenta patogenicidade nos animais (Tischer et al., 1974). O Porcine circovirus 2 (PCV2), vírus de interesse nesse trabalho, é o agente causador da postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) em suínos, enfermidade considerada multifatorial, onde outros fatores além do PCV2 são necessários para acionar a doença clínica (Segalés et al., 2005). Outras enfermidades, tais como a síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS), a pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP), a miocardite perinatal, além de falhas reprodutivas, foram denominadas doenças associadas ao PCV2 (PCVAD) e caracterizam a circovirose suína (Allan e Ellis, 2000; Almeida et al., 2004; Opriessnig et al., 2007).

A suinocultura no Brasil é considerada positiva para a circovirose suína desde 1999 (Ciacci-Zanella et al., 2001), embora tenha sido detectado recentemente o PCV2 em arquivos teciduais de suínos desde 1978 pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Dessa forma, prejuízos econômicos têm estimulado diversos grupos de pesquisa a estudar o PCV2 em granjas de suínos em diferentes regiões do território nacional (Ciacci-Zanella e Mores et al., 2001; Monnerat, 2003; Chiarelli Neto et al., 2006; Sobestiansky et al., 2002; Barcellos e Pescador et al., 2003), além da caracterização molecular de diferentes isolados brasileiros (Chiarelli Neto, et al 2009; Zanella et al., 2009)

A transferência de genes baseada em vetores de adenovírus tem se destacado na

pesquisa científica, contribuindo para um grande número de estudos tanto na virologia básica como nas mais recentes aplicações da terapia gênica e no desenvolvimento de vacinas (Hartman et al., 2008). Dessa forma, propõe-se a classificação de isolados brasileiros de porcine circovirus 2 e a produção de um candidato vacinal, utilizando cepa brasileira, por meio da construção de um sistema que codifica a expressão da proteína do capsídeo do PCV2 em vetor de adenovírus.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evolução molecular de suínos e vírus

A agricultura foi acompanhada pela domesticação dos animais. A domesticação de suínos trouxe os vírus, que adaptados e mutados, foram responsáveis por epidemias (Ujvari, 2008). Darwin em 1868 detectou duas formas de suínos domésticos, a europeia (*Sus scrofa*) e a asiática (*Sus indicus*) (Giuffra et al., 2000). A domesticação do suíno no leste asiático ocorreu na região de Mekong junto às proximidades de rios nas regiões médias e abaixo do rio Yangtze e o rio Amarelo (Wu et al., 2007). Relatos históricos indicam que suínos asiáticos foram introduzidos na Europa durante os séculos dezoito e dezenove (Giuffra et al., 2000). A domesticação impulsionou mudanças moleculares e morfológicas da grande maioria de raças de suínos (Giuffra et al., 2000; Fang et al., 2009) as quais foram mediada pelos humanos (Fang et al., 2006).

Estudos comprovaram que suínos domésticos infectados com o circovírus suíno 2 (PCV2) foram coincidentemente originados de javalis selvagens eurásianos (*Sus scrofa*) (Giuffra et al., 2000) destacando, dessa forma, uma correlação evolutiva entre patógeno (vírus) e hospedeiro (suíno) (Ramamoorthy e Meng, 2009). Análises de sequências ratificaram a ancestralidade do javali no carregamento do Porcine circovirus 2 (PCV2) em suínos domesticados (Schulze et al., 2003; Vicente et al., 2004; Csagola et al., 2006).

O PCV2 é classificado em dois grupos (grupo 1 ou PCV2b e grupo 2 ou PCV2a), com oito subgrupos (1A a 1C e 2A a 2E), sendo que a maioria dos isolados sequenciados de PCV2 se enquadra no grupo 1 (Cheung et al., 2007; Olvera et al., 2007). Um estudo baseado em análises de sequências de nucleotídeos da ORF2 realizado na Coreia demonstrou um grande índice de isolados pertencentes ao grupo 1 (94%) em detrimento ao grupo 2 (6%), sendo que isolados do subgrupo 1A foram correlacionados com animais que apresentavam sinais clínicos de PMWS (An et al., 2007).

Um fato curioso descoberto em suínos dos Estados Unidos da América foi a detecção

de infecções naturais com múltiplos genótipos de PCV2 destacando eventos de recombinação entre PCV2a/PCV2b ou grupo 2 e grupo 1, respectivamente, em campo (Hesse et al., 2007).

O genoma da ORF2 do PCV2 é relativamente conservado, no entanto existem variações nucleotídicas (1/702 a 20/702 mutações) entre isolados brasileiros de diferentes localizações geográficas (Chiarelli Neto et al., 2009). Este argumento é ratificado pelo estudo realizado por Takahagi e colaboradores em 2008 os quais mostraram variação molecular de sequências da ORF2 do PCV2 num intervalo de tempo de apenas seis meses com identidade de 92,3% (Takahagi et al., 2008).

Embora não exista uma relação geográfica ou de sequências de aminoácidos com a patogenicidade, mudanças na região de epitopos da proteína do capsídeo têm sido mais frequentes em isolados patogênicos (Olvera et al., 2007).

2.2. Caracterização do circovírus suíno 2 (PCV2)

O Porcine circovirus 2 (PCV2) é um vírus da família *Circoviridae*, não envelopado, estável em meio ambiente, resistente a pH 3,0, clorofórmio e temperatura de 70°C com DNA fita simples de 1,76Kb (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997; Tischer et al., 1982; Fenaux et al., 2004).

Uma estrutura conservada em forma de grampo denominada stem-loop, contém um motivo de nove bases conservadas (TAGTATTAC) dentro da origem de replicação do PCV2 (Heyraud et al., 1993; Mankertz et al., 1997; Stanley et al., 1995; Cheung, 2004; Meehan et al., 1997, 1998; Finsterbusch e Mankertz, 2009). A conformação da stem-loop é importante para a ligação da proteína replicase viral (Steinfeldt et al., 2001) codificada pela ORF1 do PCV2 (Vega-Rocha et al., 2007).

A ORF2 codifica uma proteína que possui uma sequência conservada de aminoácidos básicos no terminal amino e está envolvida na formação do capsídeo viral (Nawagitgul et al., 2000). A proteína codificada pela ORF2 do PCV2 possui aproximadamente 30kDa (Hamel et

al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998), com 702pb (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997). A proteína codificada pela ORF3 do genoma do PCV2 possui 105 aminoácidos e está envolvida na atividade apoptótica, interagindo com a proteína pPirh2, desestabilizando sua ação inibitória sobre p53, que por sua vez aumenta seus níveis de expressão e induz a apoptose celular (Liu et al., 2005, 2006, 2007). Em um estudo realizado por Karuppanan e colaboradores (2008), uma ORF3 mutante não foi capaz de causar apoptose em células infectadas com o vírus, além de verificarem a ausência de doença e perturbação nos linfócitos, como também menor viremia média e ausência de lesões patológicas em suínos livres de patógenos específicos (SPF) (Karuppanan et al., 2008).

2.3. Replicação viral

A entrada do PCV2 na célula é dependente da via endocítica mediada por clatrina e necessita uma acidificação do endossomo para a infecção (Misinzo et al., 2005).

O PCV2 replica por círculo rolante no núcleo de células infectadas produzindo uma forma replicativa de DNA fita dupla (RF dsDNA). A proteína Rep é a responsável pela clivagem do DNA viral formando um terminal 3'-OH livre para o início da replicação. A replicação viral é altamente dependente da maquinaria celular e a mitose é necessária para o transporte do DNA viral ao núcleo, além disso, as enzimas celulares da fase S do ciclo celular são ativas na síntese do DNA viral (Tischer et al., 1987,1995).

Apesar da replicação viral apresentar características variáveis dependente do tipo de células envolvidas, uma característica comum é o aumento da expressão da proteína do capsídeo e da replicase correlacionados com a replicação do vírus. Essa variação entre as diferentes células mostra que a replicação do PCV2 é dependente de processos celulares endocíticos e da atividade mitótica. Os processos de atividade endocítica são importantes para a internalização do vírus. A propagação do vírus dá-se pela associação entre as partículas virais com as cromátides irmãs das células filhas (Steiner et al., 2008).

O PCV2 mostra uma pluripotência para infectar células de origem mielóide, epitelial e endotelial. Isto parece ser uma explicação para a generalização da distribuição do vírus nos tecidos de animais infectados (Allan e Ellis, 2000; Opriessnig et al., 2006).

2.4. Infecção e transmissão do vírus

O PCV2 pode causar infecções persistentes em suínos, caracterizadas por viremia no sangue, tecidos e sêmen, suficiente para a caracterização da PCVAD (Rodriguez-Arrijoja et al., 2002; Larochelle et al., 2003).

Embora o PCV2 possa replicar em algumas linhagens celulares suínas (PK15, SK6), a replicação é dependente de proteínas celulares expressas durante a fase S do ciclo celular (Tischer et al., 1982, 1987).

O PCV2 é transmitido predominantemente pela via oro-nasal e distribuído pelo sistema linfático, respiratório, gastrointestinal e urogenital ratificando a presença do vírus em swabs oro-nasal, sangue, fezes e urina que são veículos contaminantes aos demais animais (Rosell et al., 1999; Okuda et al., 2003; Krakowka et al., 2005; Shibata et al., 2003). Além disso, a presença do vírus no colostro (Shibata et al., 2006) e no sêmen (Larochelle et al., 2000, Kim et al., 2001) são duas formas graves de propagação.

A transmissão do PCV2 pode ser realizada a partir de suínos infectados para os não infectados pelas formas horizontal, vertical e pelo sêmen (Kim et al., 2001; Larochelle et al., 2000). A associação do PCV2 com abortos e natimortos indica que a transmissão transplacentária também pode ser um fator importante se matrizes soro-negativas forem infectadas durante a prenhez (Allan e Ellis, 2000; West et al., 1999).

As consequências da infecção pelo PCV2 resultam em desidratação, perda de peso, taquipnéia, dispnéia, icterícia (Harding, 1997; Zanella e Mores, 2003), por vezes, diarreia aquosa (Balasch et al., 1999), letargia (Allan et al., 1999) e distúrbios do sistema nervoso (Harding, 1997), caracterizados por tremores, desordens locomotoras, prostração (Albina et

al., 2001), convulsões (Nielsen et al., 2003) e depressão (Choi et al., 2002). Adicionalmente, pode ocorrer aumento de linfonodos, principalmente superficiais, inguinais e mesentéricos (Morozov et al., 1998; Rosell et al., 1999), lesões de pele nas extremidades das orelhas, nos membros posteriores e na região ventrocaudal (Zanella e Mores, 2003), representadas por pápulas e placas avermelhadas e, por vezes, crostas; cianose das orelhas e região perianal também pode ser observada (Madec et al., 2000), além de tosse, respiração ofegante (Liu et al., 2002), pêlos grosseiros e fracos (Albina et al., 2001; Saoulidis et al., 2002) e morte súbita (Mori et al., 2000).

2.5. Aspectos clínicos e patológicos da circovirose suína

O PCV2 causa várias manifestações clínicas em suínos afetados, sendo primeiramente reconhecido por intermédio da postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). A maior parte dos isolados de PCV2 já caracterizados são agentes causadores da PMWS. A PMWS foi recentemente denominada como doença associada ao circovírus suíno (PCVAD) (Opriessnig et al., 2007). Entretanto, suínos infectados pelo PCV2 podem não apresentar PMWS. A incidência da PMWS está relacionada com co-infecções virais e patógenos bacterianos (Magar et al., 2000; Albina et al., 2001). As principais lesões da PMWS estão relacionadas com o sistema linfóide, apresentando processos de necrose e depleção linfóide, perda da arquitetura tecidual, infiltração por grandes histiócitos e células gigantes com corpos de inclusões basofílicas (Fenaux et al., 2002), além de pneumonia intersticial, nefrite intersticial, pancreatite e linfadenite linfohistiocítica a granulomatosa e hepatite (Clark, 1997; Harding e Clark, 1997). O tecido hepático é o mais afetado por inflamações, indução de apoptose com infiltração celular mononuclear no parênquima (Harding e Clark, 1997; Allan e Ellis, 2000; Harms et al., 2000) e ocorrência de icterícia e necrose do córtex renal (Segalés e Domingo, 2002).

O PCV2 tem sido associado a um conjunto de outras enfermidades além da PMWS,

como a síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS), pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP), miocardite perinatal, enteropatias, encefalites e falhas reprodutivas (Allan e Ellis, 2000). Esse conjunto de síndromes associadas ao PCV2 foi denominado de circovirose suína (Allan e Ellis, 2000; Almeida et al., 2004; Opriessnig et al., 2007). Dentro destas características, o diagnóstico da circovirose suína baseia-se na detecção do genoma do PCV2 por meio da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR e nested-PCR), análise histopatológica (com lesões similares à PMWS), imunohistoquímica, imunocitoquímica ou imunofluorescência (Segalés et al., 2005; Gava et al., 2008). As amostras utilizadas para o diagnóstico do PCV2 incluem principalmente sangue total, linfonodos, fígado e sêmen (Chae et al., 2005; Zanella et al., 2006).

2.6. Controle e prevenção da circovirose suína

O PCV2 é um vírus muito estável e persistente no meio ambiente (Kamstrup et al., 2004). Para controle da infecção devem ocorrer mudanças nas práticas de manejo, higiene e redução do estresse em diferentes estágios da criação. As medidas devem ainda incluir a redução na mistura de animais, fluxo adequado (todos dentro/todos fora) e redução na densidade de animais com cuidado especial na castração, na criação pós-desmame e nos períodos de crescimento (Segalés e Domingo, 2002). A administração de produtos imunomoduladores e tratamento pós-infecção com soro hiperimune via injeções subcutâneas têm reduzido a mortalidade de animais severamente doentes (Ferreira, 2001).

Existem perspectivas promissoras em relação ao aprimoramento de um método vacinal para o controle da circovirose suína. A grande porcentagem na conservação de genes estruturais entre diferentes isolados de PCV2 pode favorecer o estudo e a construção de agentes vacinais para seu controle (Kamstrup et al., 2004). Um dos aprimoramentos é retratado por intermédio da expressão da proteína do capsídeo do PCV2 (codificada pela ORF2) em *Lactococcus lactis* por vacinação via oral. A administração da cultura via oral

induz significativamente a resposta imune humoral em ratos, sugerindo uma vacina oral viva promissora contra o PCV2 (Wang et al., 2008).

Vacinas comerciais, tais como a Fort Dodge Suvaxyn[®] que é uma vacina quimérica do PCV1-PCV2 inativada (Fenaux et al., 2003, 2004), a vacina Ingelvac CircoFLEX[®] e a Porcilis PCV[®] Intervet que consiste da proteína do capsídeo do PCV2 expressa por baculovírus (Liu et al., 2008; Fan et al., 2008) e a vacina Merial Circovac[®] que contem partículas inativadas do PCV2 as quais são usadas na imunização de porcas (Opriessnig et al., 2007; Ramamoorthy e Meng, 2009) não têm apresentado proteção total nos animais além das doses apresentarem alto custo para os produtores.

2.7. Resposta imune

A eficiência da defesa imune é dependente da interação entre as células dendríticas convencionais e células dendríticas plasmocitárias junto com outros monócitos (Kenneth et al., 2009). O PCV2 possui ineficiência em se replicar nas células dendríticas, por outro lado, evidências recentes sugerem que o vírus replica em células endoteliais (Kenneth et al., 2009). Família de células dendríticas representam elementos de defesa imune crítica para a modulação por infecção viral com sérias consequências para a resistência do hospedeiro frente às doenças (Kenneth et al., 2009). As características da modulação imune dependem do vírus e o conjunto de células dendríticas envolvidas. O papel desempenhado pelas células dendríticas plasmocitárias são decisivos para moldar os resultados das infecções e as características imunológicas induzida por vírus (Kenneth et al., 2009).

Os linfócitos do sangue periférico (PBL) de suínos com circovirose suína estimulados pela Concanavalina-A mostraram-se com uma carga viral alta mensurada pelo número de cópias de DNA de PCV2 ou título viral quando comparados com PBLs de suínos sadios infectados pelo PCV2. Este evento experimental relata a susceptibilidade de linfócitos T e B à infecção pelo PCV2, evidenciando que o PCV2 é capaz de replicar em linfócitos em divisão

(Lin et al., 2008).

Polimorfismos genéticos são responsáveis por uma grande diversidade de antígenos apresentados por moléculas de MHC a receptores de células T, o que acarreta, na maioria das vezes, respostas imunológicas diversas entre os animais diante de um agente infeccioso. Células T indicam epítopos imunodominantes com reatividade não uniforme em relação à variabilidade dos vírus, mostrando que suínos e PCV2 não são exceções na influência da diversidade genética (Stevenson et al., 2007). Isto tem mostrado que certas raças de suínos, como suínos Landrace, são aparentemente mais susceptíveis ao PCV2 que os suínos Duroc e Large White (Opriessnig et al., 2006).

A presença do PCV2 junto a agentes co-infecciosos estimulam a proliferação viral em linfócitos T e B, além da ativação imune da via MHC II, receptor de IL-2 e respostas similares entre as vias Th1 e Th2. Um distúrbio no balanço das citocinas somado a fatores do hospedeiro pode induzir a PCVAD baseada na diminuição dos níveis de IgM e anticorpos neutralizantes (Ramamoorthy e Meng, 2009). Suínos com infecção subclínica apresentam um aumento dos níveis de IL-10 levando ao aumento dos níveis de IgM e IgG, além de apresentar baixa replicação do vírus em células dendríticas e monócitos (Darwich et al., 2008). Por outro lado, a resposta inflamatória pode levar a danos teciduais bem como a manifestação clínica de PCVAD (Ramamoorthy e Meng, 2009).

O perfil de mRNA de interleucinas (IL-10) no soro e órgãos linfóides de suínos saudáveis e afetados com PMWS sugere a teoria de que o PCV2 é imunossupressor. O aumento de mRNA de IL-10 no timo está associado com a depleção tímica e atrofia, que é observada em suínos com PMWS. A comparação entre suínos infectados subclínicamente e não infectados mostrou que o perfil de IL-10 no soro é similar ao perfil de viremia (Darwich et al., 2008).

Infecções com outros patógenos, como co-infecção com parvovírus suíno (PPV), além de estresse, vacinação e inseminação com sêmen contaminado aumentam os casos de PCVAD em suínos (Kim et al., 2006). Esses fatores sugerem que as condições de manejo na granja, a

diversidade genética dos PCV2 e o sistema imune do hospedeiro são fundamentais para o controle da circovirose suína (Kekarainen et al., 2008).

2.8. Adenovírus como veículo de expressão em mamíferos

Adenoviridae é uma família de vírus de DNA fita dupla não-envelopado que infectam animais vertebrados, causando doenças do trato respiratório, conjuntiva, córnea, trato gastrointestinal e genit urinário. O adenovírus foi primeiramente isolado a partir de adenóides dos pacientes infectados em 1953 e, desde então, tornou-se um modelo para elucidar aspectos fundamentais de expressão gênica em células de mamíferos, por exemplo descoberta do *splicing* (Philipson, 1995).

Estudos estruturais do adenovírus completo, como também de proteínas do capsídeo individuais, têm sido estudados em paralelo com a biologia molecular de infecção de adenovírus, dando perspicácias fundamentais na montagem, arquitetura e mecanismo de entrada do vírus nas células. Estes assumiram a importância de criar adenovírus para aplicações de vetor (Cusack, 2005).

O genome de adenovírus inclui aproximadamente 36 kilobases e codifica um proteoma de 45 proteínas das quais são achados aproximadamente somente 12 na partícula viral. A partícula tem uma massa molecular total de 150 MDa e é notadamente na forma icosaédrica, com um diâmetro de cerca de 900 Å (Campos e Barry, 2007). O cerne do vírus contém o DNA complexado com pelo menos quatro proteínas (pV, pVII, pX e proteína terminal, TP). As 20 facetas do capsídeo são cada uma construída de 12 proteínas organizadas em uma pseudo superfície e arranjadas com quatro proteínas de capsídeo secundárias que participam das interações com receptores celulares (Cusack, 2005).

A maioria dos adenovírus adsorve na célula por meio da ligação entre a cabeça da fibra trimérica com o domínio da região N terminal do receptor celular de adenovírus (CAR). A internalização dá-se pela interação da base pentamérica com a base celular rica em

integrinas (Cusack, 2005).

O adenovírus é considerado um dos mais eficientes vetores de transferência de genes para células de mamíferos, com potenciais aplicações em terapia gênica, genética das doenças, vacinação e tratamento de câncer (Cusack, 2005). O genoma dos adenovírus pode incorporar, aproximadamente 2 Kb de sequência de DNA adicional sem perder a sua estabilidade e viabilidade. Para a adição de fragmentos maiores de DNA é necessária a deleção de parte do genoma do vírus (Tashiro et al., 1999). Por todas estas razões, a biologia molecular do adenovírus tem sido continuamente estudada e vetores de adenovírus são eficazes na adsorção e entrada na célula, na expressão de transgenes e na driblagem da resposta imune. O vírus induz uma expressão diferenciada em um passo após a captação celular por meio do aumento da liberação de adenovírus no endossomo (Cusack, 2005).

O adenovírus como vetor de transferência genética possui características seletivas, pois há receptores específicos para o vírus (Lee e Welsh, 1999). Por outro lado, as células de fibroblasto de rim embrionário humano (HEK 293) são excelentes veículos para adsorção de adenovírus recombinantes (Gao et al., 2003).

Uma abordagem para inibir a resposta imune provocada pelo adenovírus tem sido a estratégia, na construção destes vetores, de remover genes funcionalmente importantes nos mecanismos imunológicos que diminuem significativamente os títulos resultantes, tornando os vetores mais difíceis de produzirem uma resposta imune (Cheshenko et al., 2001; Kimura et al., 2001).

A proteína do capsídeo codificada pelo gene da ORF2 do PCV2 tem sido um excelente candidato vacinal, visto que esta proteína apresenta três regiões de resíduos aminoacídicos com características imunogênicas. Dessa forma, o adenovírus recombinante (rADN-Cap) pode ser um agente vacinal promissor que expressa a proteína do capsídeo do PCV2 (Wang et al., 2006; 2007) e, conseqüentemente, pode gerar uma resposta imune contra o circovírus suíno 2.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética do PCV2 no Brasil e construir um sistema de expressão gênica contendo a sequência de nucleotídeos codificadora da proteína do capsídeo do circovírus suíno 2 em um vetor de adenovírus e avaliar seu potencial imunogênico.

3.2. Objetivos específicos

- Classificar os isolados brasileiros conforme o modelo de Olvera e colaboradores, 2007;
- Avaliar a diversidade genética do vírus no Brasil;
- Estudar a origem do vírus no Brasil;
- Construir um sistema de expressão da ORF2 do PCV2 em adenovírus;
- Produzir vírus recombinantes em células HEK 293;
- Detectar a expressão da proteína do capsídeo do PCV2 por adenovírus em linhagem de células HEK 293;
- Purificar o adenovírus recombinante;
- Titular as progênies dos vírus purificados;
- Imunizar camundongos BALB/c com o adenovírus recombinante;
- Avaliar a resposta imunológica.

CAPÍTULO 1

Chiarelli Neto, O., Yotoko, K. C. S., Vidigal, P.M.P., Silva, F. M. F., Castro, L. A., Fietto, J. L. R., Silva-Junior, A., Almeida, M. R. 2009. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. Virus Research, 140: 57-63.

Article history:
Received 28 July 2008
Received in revised form 3 November 2008
Accepted 3 November 2008
Available online 16 December 2008

RESUMO

Classificação e origem putativa do Porcine circovirus 2 no Brasil por meio de uma abordagem filogenética e filogeográfica.

O Porcine circovirus 2 (PCV2) é o principal agente causador da postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) e está associado a diferentes síndromes em suínos. O genoma do PCV2 possui três ORFs principais, sendo a ORF2 a codificadora da proteína do capsídeo viral. Neste trabalho, foram analisadas as regiões genômicas correspondentes à ORF2 de 30 isolados brasileiros de PCV2. As seqüências foram comparadas a outras seqüências disponíveis no GenBank, sendo implementadas análises filogenéticas e filogeográficas. Nossos resultados mostraram uma alta variabilidade de seqüências no Brasil. Os isolados brasileiros foram classificados nos subgrupos 1AB, 2D e 2, com relevância de que o vírus foi introduzido no Brasil mais que uma vez. Por outro lado, muitos dos isolados são derivados de uma única introdução. Conforme os dados da Associação Brasileira dos Criadores de Suínos (ABCS), a introdução múltipla do vírus provavelmente ocorreu por meio da importação de animais assintomáticos ou sêmen contaminado. Os resultados apontam um controle maior nas importações dos animais para evitar a entrada do PCV2 grupo1 no Brasil.

ABSTRACT

Classification and putative origins of Brazilian Porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches.

O. Chiarelli Neto^a, K.S.C. Yotoko^d, P.M.P. Vidigal^a, F.M.F. Silva^a, L.A. Castro^e, J.L.R. Fietto^{a,b}, A. Silva Jr.^{a,c}, M.R. Almeida^{a,b,*}

a Molecular Animal Infectology Laboratory, Applied Biotechnology Institute (BIOAGRO), Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

c Animal Virology Laboratory, Veterinary Medicine Department, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

d General Biology Department, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

e Molecular Virology Laboratory, Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 14049-900, Brazil.

Porcine circovirus 2 (PCV2) is the major causative agent of postweaning multisystemicwasting syndrome (PMWS) and is associated with different syndromes affecting pigs. The PCV2 genome has three main open reading frames (ORFs) among which the ORF2 encodes the capsid protein. In this study, the ORF2 nucleotide sequences of 30 Brazilian isolates were analyzed. The sequences were compared to other GenBank sequences using phylogenic and phylogeographic approaches. Our results show high sequence variability in Brazil, since, in this work, the Brazilian isolates were classified into subgroup 1AB, 2D and 2, which reveals that the virus was introduced in Brazil more than once. On the other hand, most of Brazilian isolates seem to be derived from only one introduction. According to the data from the Pig Breeder's Association, the multiple introductions of the virus probably occurred through the import of animals with the asymptomatic form of the virus or through the import of contaminated semen. The results point to the necessity of implementing programs aimed at selecting sows in order to avoid the import of animals infected by Group 1 PCV2.

Keywords: PCV2, Bayesian Inference, Haplotypes networks

1. INTRODUÇÃO

O Porcine circovírus 2 (PCV2) é um vírus não envelopado pertencente ao gênero *Circovirus* e família *Circoviridae*. O genoma deste vírus é constituído de DNA fita simples circular ambisenso e com aproximadamente 1,76 Kb (Lukert et al., 1995). O genoma do PCV2 possui três principais ORFs que codificam proteínas bem caracterizadas: a ORF1 que codifica a replicase viral, a ORF2, codificadora da proteína do capsídeo viral, e a ORF3, que codifica uma proteína indutora de apoptose celular e fundamental no desenvolvimento da patogênese viral (Morozov et al., 1998; Liu et al., 2006). Dois tipos de Porcine circovirus (PCV) foram caracterizados, PCV1 e PCV2. O PCV1 foi descrito inicialmente como um infectante de linhagens celulares de rim de porco (PK15) e não apresenta patogenicidade (Tischer et al., 1974). Por outro lado, o PCV2 é o principal agente causador da síndrome da refugagem multissistêmica pós-desmame (PMWS) em suínos, enfermidade considerada multifatorial. Fatores adicionais, além do PCV2, são necessários para o desenvolvimento da doença clínica (Segalés et al., 2005). Outras enfermidades, tais como a síndrome da dermatite e nefropátia suína (PDNS), a pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP), a miocardite perinatal, além de falhas reprodutivas, estão associadas ao PCV2 (Allan e Ellis, 2000). A terminologia circovirose suína tem sido usada corretamente para se referir a essas doenças quando associadas ao PCV2 (Almeida et al., 2004).

Os prejuízos econômicos causados por diversos agentes patogênicos estimularam os estudos de diversidade genética no intuito de melhor compreender os mecanismos evolutivos e epidemiológicos dos mesmos (Dulac e Ahmad, 1989; Tisher et al., 1986, 1995). Estudos utilizando o método de variações polimórficas de fragmentos de restrição (RFLP) foram realizados na tentativa de classificar o genoma completo do PCV2 no Canadá (Hamel et al., 2000), na China (Wen et al., 2005) e no Japão (Takahagi et al., 2008).

Baseados em estudos filogenéticos, um modelo de classificação do PCV2 tem sido

proposto por Olvera e colaboradores. (2007). Sua classificação é dividida em grupo 1 (subdividido em 1A-1C) e grupo 2 (subdividido em 2A-1E). Diversos estudos têm demonstrado que isolados provenientes de animais que apresentam a PMWS são mais freqüentemente incluídos no grupo 1, enquanto que isolados provenientes de animais que não apresentam a doença são incluídos no grupo 2 (Grau-Roma et al., 2008; An et al., 2007).

No Brasil, devido aos prejuízos causados pela PMWS, diversos grupos de pesquisa têm isolado o PCV2 proveniente de diferentes regiões brasileiras (Ciacci – Zanella e Mores, 2001; Chiarelli Neto et al., 2006; Sobestiansky et al., 2002; Barcellos e Pescador, 2003). No interesse de investigarmos a epidemiologia do vírus, nós sequenciamos a ORF2 do PCV2 de 11 novos isolados provenientes de diferentes estados para (1) classificá-los conforme o modelo de Olvera e colaboradores (2007), (2) avaliar a diversidade genética do vírus no Brasil e (3) estudar a introdução do vírus no país.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Virologia localizado no setor de Medicina Veterinária Preventiva e de Saúde Pública (DVT), todos na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Isolamento do PCV2

Um total de onze amostras obtidas a partir de animais com sintomatologia clínica, foram coletadas, em 2005, nos Estados da Bahia (EU755378), Espírito Santo (EU755371, EU755372, EU755374, EU755379), Minas Gerais (EU755376), Paraná (EU755373), Santa Catarina (EU755377, EU755381) e São Paulo (EU755375, EU755380) (Fig. 1). Após a coleta, cada amostra foi imediatamente congelada a -20°C e utilizada para o isolamento das cepas virais em células renais de suíno (SK6) livres de PCV2. As células foram inicialmente cultivadas em estufa a 37°C e CO₂ a 5% supridas de Meio Essencial Mínimo (MEM) a 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e antibióticos streptomomicina (1g/L) e penicilina (0,75g/L). Após a incubação por 24 horas, as células inoculadas com o PCV2 foram tratadas com D-glicosamina 300mM (Sigma, Alemanha) e incubadas por 48 horas a 37°C e CO₂ a 5%. O DNA total das células foi extraído pelo Kit Genomic DNA Purification from Tissue (Promega, EUA) depois de duas passagens em cultivo celular.

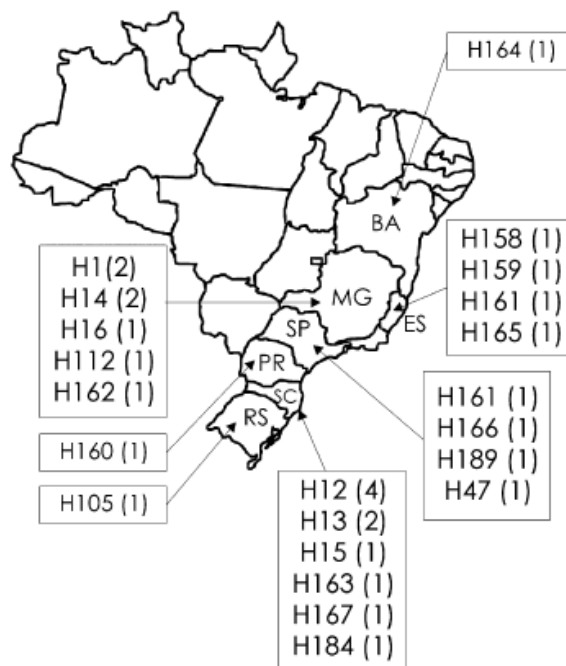


Figura 1: O mapa mostra os locais de coleta de isolados de PCV2. Os números entre parênteses () correspondem às frequências de cada haplótipo nos estados brasileiros: BA, Bahia, ES, Espírito Santo, MG, Minas Gerais; PR, Paraná, SC, Santa Catarina, SP, São Paulo, RS, Rio Grande do Sul.

2.2. Amplificação, clonagem e sequenciamento da ORF2

A amplificação do fragmento de DNA viral de 702 bp correspondente à região codificadora da ORF2 foi realizada pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando *primers* específicos: FCAP 5'-CGGCTAGCCGATGACGTATCCAAG-3' (*Forward*) e RCAP 5'-GACGCGTCGTTAGGGTTTAAGTG-3' (*Reverse*), construídos a partir da sequência do genoma do isolado brasileiro de PCV2 (DQ364650) depositada no GenBank. A mistura da reação para o ensaio da PCR foi constituída de tampão de reação 10X (Tris-HCl 10mM, pH 9,0 e KCl 50mM, MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs 10 mM, 0,3M de cada oligonucleotídeo e Taq DNA polimerase 2,5U/μL. Após a adição do DNA (2 μL), a mistura foi transferida para um termociclador (MJC, Inc. PTC-100, EUA). A reação da PCR consistiu de uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e a 72°C por 1 min. A etapa final de extensão foi de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR dos isolados foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T Easy, utilizando o Kit *pGEM -T - Easy*[™] (Promega, EUA) conforme manual do fabricante. Os DNAs plasmidiais foram purificados utilizando o Kit *Wizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA) e, em seguida, os mesmos foram submetidos à reação de sequenciamento de acordo com Sanger e colaboradores (1977), em aparelho MegaBACE 1000 (GE Healthcare, EUA), utilizando os *primers* M13 *Forward* e *Reverse*.

2.3. Análises das seqüências de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos da ORF2 do genoma do PCV2 foram editadas com o aplicativo Chromaspro1.34 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) para retirada de regiões do vetor. Foi feita uma busca no GenBank de outras seqüências da ORF2 do PCV2, as quais foram alinhadas juntamente com as obtidas neste trabalho com o auxílio do programa ClustalW, utilizando configurações padrão (Thompson et al., 1994) e Mega 4 (Tamura et al., 2007). Todas as seqüências usadas estão no anexo 1.

A hipótese filogenética foi construída por Inferência Bayesiana (BI) usando o programa MrBAYES 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003; Huelsenbeck e Ronquist, 2005). Para agilizar a construção das árvores, um modelo básico de substituição de nucleotídeos foi utilizado com o auxílio do programa MrModeltest (Nylander et al., 2004), que fornece ao MrBAYES os parâmetros que deverão ser estimados para evitar o excesso de parâmetros dos modelos a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanhos de ramos. Uma análise inicial foi feita utilizando todas as seqüências disponíveis no GenBank, além das seqüências obtidas neste trabalho (total de 331 seqüências). De modo a simplificar a visualização da árvore filogenética, foi realizada uma segunda análise contendo seqüências de isolados brasileiros e um número limitado de seqüências presentes no GenBank, utilizadas no modelo de classificação proposto (Olvera et al., 2007). Somente seqüências únicas foram incluídas uma vez que todas as seqüências que apresentavam 100% de identidade com outra já incluída, não foram consideradas de modo a avaliar as relações dos diferentes haplótipos, perfazendo um total de 93 seqüências.

Uma vez construída a árvore filogenética, nós localizamos os haplótipos brasileiros com os respectivos grupos e subgrupos e construímos a rede de haplótipos (Bandelt et al., 1999) usando os grupos que continham as seqüências brasileiras para visualizar a relação destas seqüências com as seqüências depositadas no GenBank. Estas análises foram feitas com o algoritmo Median Joining (MJ) implementado pelo programa Network 4.2.0.1.

3. RESULTADOS

A figura 2 (árvore filogenética) mostra uma hipótese filogenética simplificada feita neste estudo que destaca o uso de 93 haplótipos da ORF2 do PCV2. Esta árvore mostra quase todos os grupos e subgrupos proposto por Olvera e colaboradores (2007). Uma diferença apenas, nesta árvore apresentada, é que o subgrupo 1A e 1B foram agrupados em um único grupo 1AB. A maioria das seqüências do GenBank bem como as brasileiras (28/30), foram incluídas no subgrupo 1AB. Por outro lado, uma seqüência brasileira (DQ856568) foi incluída no haplótipo H184 classificada como 2D. A árvore filogenética também mostrou a existência de uma seqüência de isolado brasileiro (DQ856572-H189) próximo ao subgrupo 2A e 2D mas não foi classificada em nenhum subgrupo referente ao grupo 2 (árvore filogenética).

A figura 3 mostrou a rede de seqüências do subgrupo 1AB, contendo todas as seqüências classificadas dentro deste subgrupo construída preliminarmente pela árvore filogenética completa (dados não mostrados). Diferentemente da árvore filogenética, a rede permite a representação da freqüência na qual cada haplótipo surgiu, assim como a marcação de seqüências quanto à sua origem geográfica. Neste trabalho, nós trabalhamos com seqüências brasileiras, norte-americanos, européias e asiáticos. Neste sentido, é perceptível que o haplótipo H1 é freqüente em vários locais: Europa, Ásia e também no Brasil. Este haplótipo ocupa uma posição central na rede. Vários outros haplótipos, provenientes de diferentes continentes, mostram apenas uma diferença de nucleotídeos em comparação com o haplótipo H1, sugerindo sua ancestralidade. Também é possível observar uma agregação de seqüências da América do Norte (haplótipos mostrado em preto não marcados com +), que não parecem estar relacionadas às seqüências brasileiras (haplótipos mostrado em preto marcado com +). Além disso, a figura 3 revela também que apenas o haplótipo H47 é divergente em relação a outros haplótipos brasileiros.

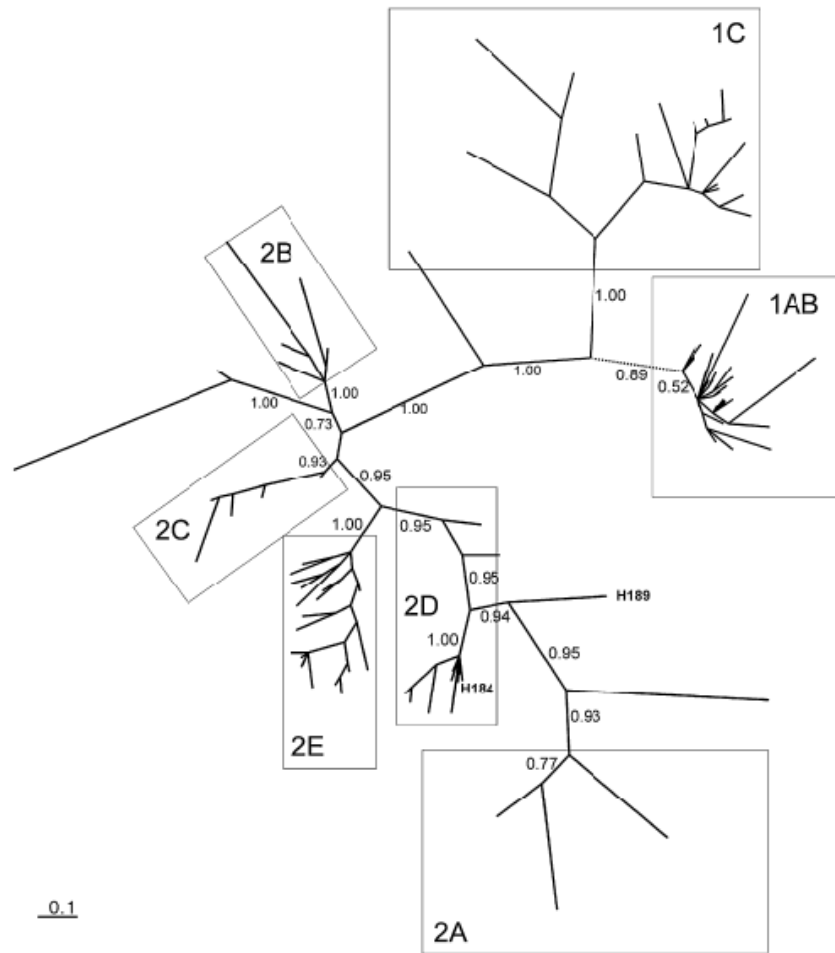


Figura 2: Árvore consenso obtida pela análise Bayesiana dos 93 haplótipos da ORF2-PCV2. A melhor árvore construída pelo MrBayes evidenciou o modelo de classificação em subgrupo do PCV2 proposto por Olvera e colaboradores (2007). A maioria dos haplótipos foram classificados no subgrupo 1AB com exceção do H184 e H189, classificados no grupo 2.

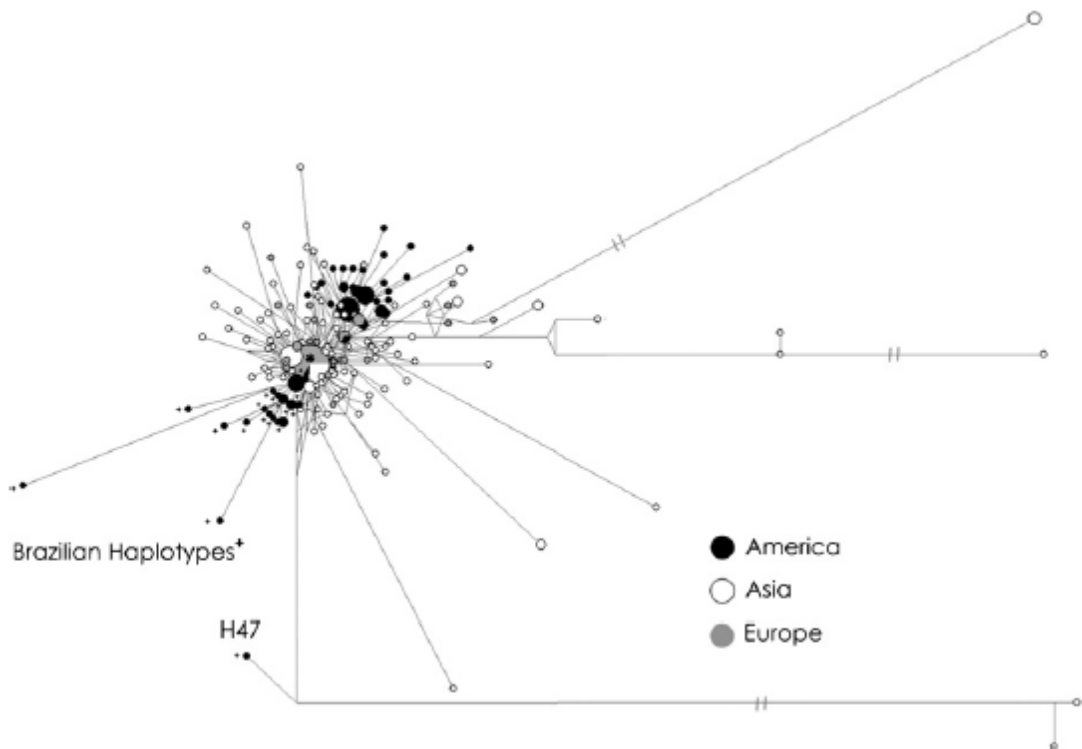


Figura 3: Rede de haplótipos do subgrupo 1AB construída pelo aplicativo Network v 4.2.0.1. O tamanho das circunferências é proporcional às frequências relativas dos haplótipos. O asterisco marca o haplótipo H1 e o sinal (+) marca os haplótipos encontrados exclusivamente no Brasil.

Também com base na árvore filogenética completa, foi construída uma rede de haplótipos utilizando seqüências do grupo 2 provenientes do GenBank (60 seqüências), bem como as seqüências brasileiras do mesmo grupo. (H184 e H189). O H184 foi classificado no subgrupo 2D com uma seqüências oriunda do Brasil, duas na Europa (Alemanha e Hungria) e uma da Ásia (China) (anexo 1). Por outro lado, o H189, cuja seqüência oriunda de São Paulo, se destacou como seqüência exclusiva sem classificação em subgrupos, como já mencionado na figura 2. No entanto, o H189 parece estar geneticamente ligado ao H171 da Alemanha, como evidenciado na figura 4.

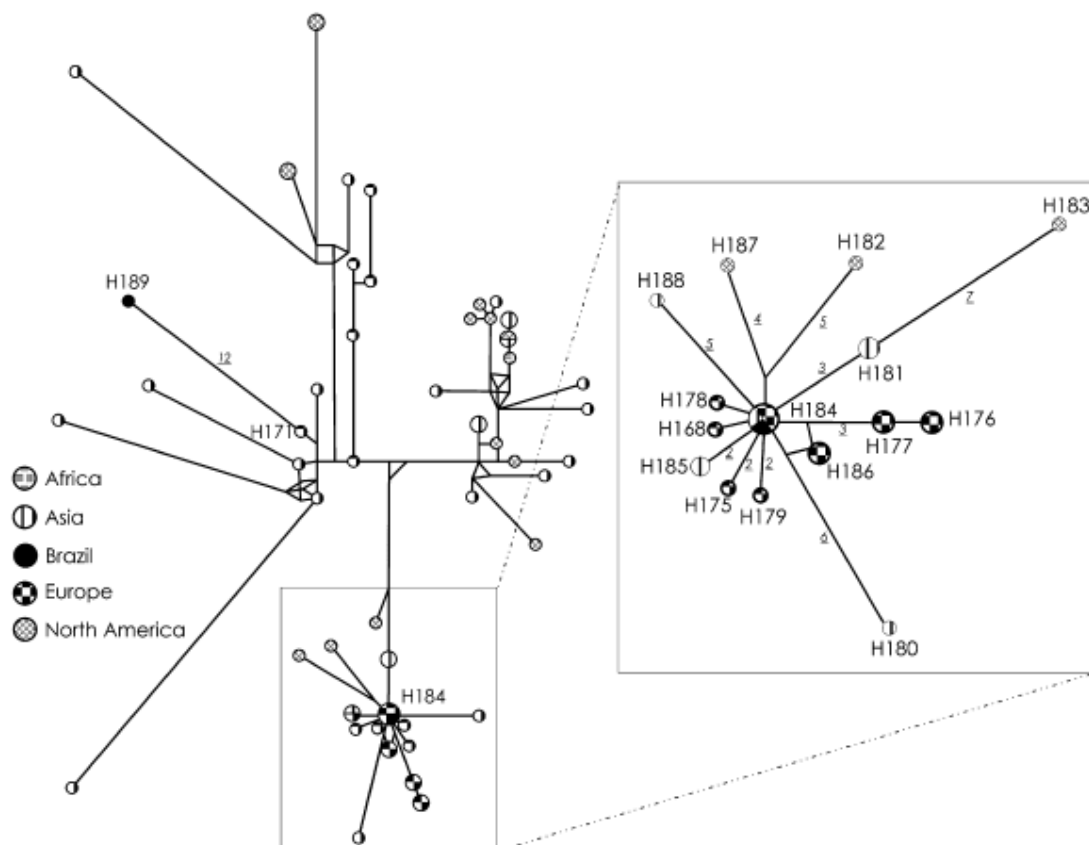


Figura 4: Rede de haplótipos do grupo 2 construída pelo aplicativo Network v 4.2.0.1. O tamanho das circunferências é proporcional às frequências relativas dos haplótipos. O H184 e H189 correspondem aos haplótipos brasileiros classificados no Grupo 2. A ampliação do subgrupo 2D, que contém o H184 correspondente às seqüências do Brasil, Europa e China.

Finalmente, a figura 5 mostra as relações dos isolados brasileiros com o haplótipo H1. Vinte e oito de trinta isolados brasileiros foram agrupados no subgrupo 1AB. Dois deles foram classificados como H1, e os outros 26 são claramente descendentes de H1, sendo encontrada exclusivamente no Brasil. Além disso, a maioria dos isolados brasileiros foram derivados de H12 (seis deles foram classificados como H12), exceto para H47 que não está claramente relacionado com H12 - H105, H162 e, provavelmente, H13 e H14 (Fig. 5).

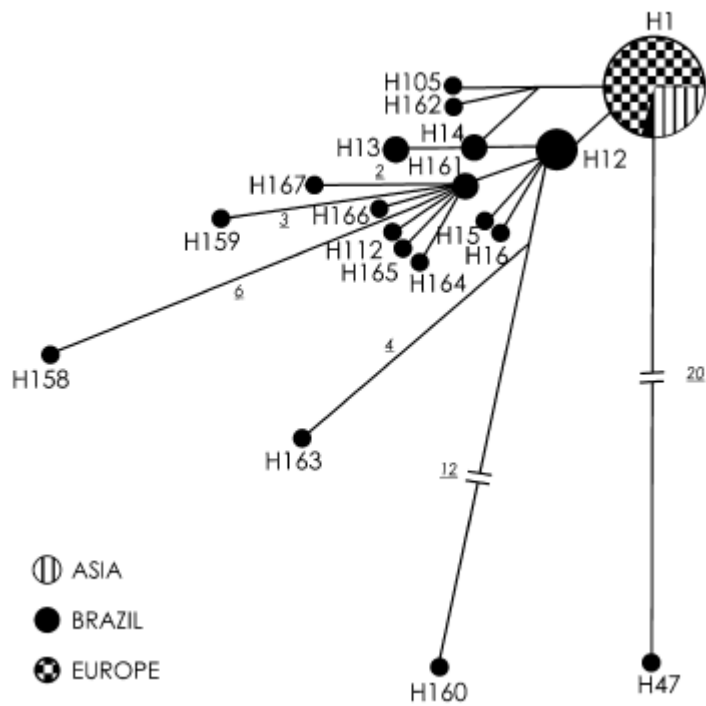


Figura 5: Ampliação da rede de haplótipos brasileiros encontrados no subgrupo 1AB. O tamanho das circunferências é proporcional às frequências relativas dos haplótipos. O número de substituições entre cada par de haplótipos está representado ao lado da linha que os conecta.

4. DISCUSSÃO

O primeiro objetivo deste trabalho foi classificar os isolados brasileiros do PCV2 utilizando o sistema proposto pela Olvera e colaboradores (2007). Para isso, foi construído uma árvore filogenética, incluindo 30 isolados brasileiro de PCV2, entre as quais 11 foram derivados deste estudo e 301 correspondem a seqüências não-brasileiras (ver anexo 1). A figura 2 mostra a árvore filogenética simplificada que contém todos os grupos e subgrupos propostos pela Olvera e colaboradores (2007).

Em um total de 30 seqüências brasileiras, 28 foram classificadas no subgrupo 1AB e apresentaram alta identidade de nucleotídeos com haplótipo H1, o haplótipo mais freqüente encontrado neste estudo (Fig. 3). Entre estas 28 seqüência, apenas o haplótipo H47 (DQ856573) apresentou um elevado número de substituições de nucleotídeos quando comparado com H1 (ver Fig. 3 e 5). Os demais 27 haplótipos apresentaram uma maior identidade de nucleotídeos com a H1 (Fig. 5). A figura 5 também mostra que essas 27 seqüências estão estreitamente relacionadas, sendo duas delas classificadas como H1 e as demais 25 são claramente descendentes de H1. As duas seqüências restantes, denominadas como H184 e H189, foram classificadas no grupo 2. O haplótipo H184 foi classificado no subgrupo 2D com seqüências do Brasil, Alemanha, Hungria e China. Já o haplótipo H189 não foi classificado em subgrupos apesar de está correlacionado com o haplótipo H171 originado da Alemanha.

No que diz respeito a diversidade genética do PCV2 no Brasil, nossa segunda questão, uma pequena amostra de 30 isolados revelou relação de seqüências muito distante, o que significa que o vírus foi introduzido no Brasil mais de uma vez, pois existem isolados classificados em subgrupos 1AB, 2D e há um isolado que não foi classificado em subgrupos conforme o modelo de classificação de Olvera e colaboradores (2007). A presença de seqüências não classificadas podem significar que a diversidade genética do vírus é tão grande que o sistema de classificação, testado em centenas de seqüências, não pode abranger todas as

diversidades. É importante enfatizar, no entanto, que a diversidade genética dos isolados brasileiros está concentrada no subgrupo 1AB, com apenas duas exceções.

No que diz respeito à nossa terceira questão, que foi para testar se o vírus foi importado de matrizes europeias, a nossa amostragem pode responder, pelo menos, uma parte da questão. Dada a alta frequência de H1 e sua prevalência em todo mundo, é difícil afirmar que todos os isolados brasileiros agrupados no subgrupo 1AB são derivados de uma única origem. No entanto, devido ao fato de que a maioria deles parece derivar de H12 (H12 que foi amostrada exclusivamente no Brasil, ver anexo 1), é possível inferir que, pelo menos, 21 isolados (ou talvez 25, se incluirmos os isolados classificados como haplótipos H13 e H14, ver Fig. 5) compartilham um ancestral comum, e são, portanto, derivados da introdução de um único evento, no Brasil. É importante ressaltar que estas 25 seqüências foram amostrados exclusivamente no Brasil (anexo 1) e que as substituições de nucleotídeos encontrados nestes haplótipos não são compartilhados por haplótipos amostrados em outros países, demonstrando que tais substituições ocorreram após a introdução no Brasil.

O haplótipo H1 também parece ser o ancestral comum da maioria dos isolados provenientes da Ásia e da América, e está amplamente distribuído na Europa (anexo 1 e Fig. 3). Da mesma forma, H184 foi encontrado no Brasil, Europa e China, enquanto H189 é parente distante do haplótipo europeu (H171). Considerando apenas esses dados, é muito difícil afirmar se o vírus brasileiros descendem de linhagens predominantemente da Europa ou da Ásia, já que quase todos os haplótipos brasileiros - exceto H189 - são idênticos ou são descendentes de haplótipos que é muito comum na Europa e na Ásia. No entanto, a importação de animais e sêmen da Europa pelo programa de melhoramento de suínos no Brasil, sugere que a introdução do vírus é derivada de porcas ou sêmen europeu. Infelizmente, não é possível determinar o ano exato da introdução de qualquer destes haplótipos no Brasil. No entanto, dados da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (dados não publicados) mostram altas taxas de importação de animais e sêmen da Europa alguns anos antes da data da primeira descrição da PMWS no Brasil em 2000 (Ciacci-Zanella e Mores, 2003). Dado que o

processo de amostragem foi realizado em diferentes regiões brasileiras bem como de criadores de porco independentes, é razoável inferir o fato de que nossa amostragem é pequena, no entanto pode ser significativa, e pode sugerir que a maioria dos animais brasileiros infectados ter contraído o vírus de linhagens brasileiras, o que provavelmente é descendente dos poucos eventos de introdução do vírus no Brasil por meio de porcos europeus.

Se nossa amostragem brasileira é de fato significativa, os resultados indicam que apenas algumas introduções do PCV2 foram suficientes para disseminar a PMWS no Brasil. Se juntarmos isso ao fato de que linhagens de vírus poderiam recombinar e, eventualmente, formar novas linhagens, potencialmente mais infecciosas, é imprescindível evitar a importação de novas linhagens de outros países. Já que o PCV2 precisa ser associado a outros agentes infecciosos e fatores não-infecciosos (Segalés et al., 2005), é possível que outros isolados foram introduzidos no Brasil em sua forma assintomática ou com sêmen importado. Assim, para manter a expansão de mais isolados patogênicos e evitar os danos resultantes dessa expansão é importante um manejo adequado dos animais, principalmente obstruindo a co-infecção de PCV2 potencialmente mais patogênicas com outros agentes infecciosos. Além disso, é igualmente necessário desenvolver um programa seletivo para a importação de matrizes em que as amostras são submetidas a testes de diagnóstico com o objetivo de identificar as porcas e sêmen contaminado com PCV2 do grupo 1, evitando a introdução de variantes patogênicas do vírus no Brasil.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo suporte financeiro da pesquisa referente a este capítulo.

6. REFERÊNCIAS

- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
- Almeida, M.R., Silva Jr., A., Castro, L.A., Almeida, S.R., Monnerat, F.S., Oliveira, F.S., Moraes, M.P., 2004. Porcine circoviruses. *Virus Rev. Res.* 09, 32–42.
- An, D.J., Roh, I.S., Song, D.S., Park, C.K., Park, B.K., 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res.* 129, 115–122.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Barcellos, D.A., Pescador, C.E., 2003. Circovirose Suína. *Sanidade em foco* 6, 3.
- Castro, A.M.M.G., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Arch. Virol.* 152, 1435–1445.
- Chiarelli Neto, O., Silva Jr., A., Castro, L.A., Viana, V.W., Silva, F.M.F., Bonfá, G., Moraes, M.P., Almeida, M.R., 2006. Detecção do Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em animais de abate no centro norte do estado do Espírito Santo. *Scientia* 7, 33–44.
- Ciacchi-zanella, J.R., Mores, N., 2001. Diagnostico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovírus Suíno Tipo 2. *Comunicado técnico – EMBRAPA – CNPSA 270*, 1–3.
- Ciacchi-zanella, J.R., Mores, N., 2003. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55, 522–527.
- Dulac, G.C., Ahmad, A., 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCCCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53, 431–433.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., L'opez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2)

- genotype definition and their relation with postweaning multisystemicwasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128, 23–35.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E., Nayar, G.P., 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64, 44–52.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen, R. (Ed.), *Statistical Methods in Molecular Evolution*. Springer, New York.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H.,Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80, 5065–5073.
- Lukert, P.D., De Boer, G.F., Dale, J.L., Keese, P., McNulty, M.S., Randles, J.W., Tischer, I., 1995. The Circoviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), *Virus Taxonomy: Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Verlag, Vienna and New York, pp. 166–168.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, G., Morgan, M.K., Yoon, K., Paul, P.S., 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2535–2541.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves Aldrey, J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Syst. Biol.* 53, 47–67.
- Olvera, A., Cortey,M., Segales, J., 2007.Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES: 3 Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.

- Sobestiansky, J., Barbarino, J.R.P., Seyboth, L., Matos, N., 2002. Circovirose Suína e circovírus suíno. *Sanidade em foco* 4, 52.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F., Murakami, H., 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 603–606.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., Germann, B., 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140, 737–743.
- Tischer, I., Mielsch, W., Wolff, D., Vagt, M., Greim, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91, 271–276.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell line. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A)* 226, 153–167.
- Wen, L., Guo, X., Yang, H., 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet. Microbiol.* 110, 141–146.

CAPÍTULO 2

**Construção e caracterização de um adenovírus recombinante que
expressa a proteína do capsídeo do PCV2**

RESUMO

Chiarelli Neto, Orlando, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009.
Construção e caracterização de um adenovírus recombinante que expressa a proteína do capsídeo do PCV2. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.
Conselheiros: Francisco Murilo Zerbini Júnior, Juliana Lopes Rangel Fietto e Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um dos responsáveis pela circovirose suína, doença de caráter multifatorial e emergente na suinocultura nacional e que envolve diversas apresentações clínicas. O PCV2 possui a ORF2 como codificadora da proteína do capsídeo e caracterizada como imunogênica. Nosso objetivo, dessa forma, foi construir um sistema de expressão gênica da ORF2 do PCV2 em um vetor de adenovírus. A ORF2 foi clonada em vetor pGEM T-easy e em seguida o plasmídeo recombinante pGEM-ORF2 foi introduzido por meio da reação de transformação em Células de *Escherichia coli* DH5 α . A clonagem foi confirmada por sequenciamento e ensaio de restrição com a enzima *EcoRI*. Confirmada a clonagem, o plasmídeo foi clivado pelas enzimas *AclI* e *NheI*, liberando a ORF2. Este segmento foi clonado no vetor pAD5-Blue previamente clivado pelas enzimas *ClaI* e *XbaI*. Células de *E. coli* TOP10 foram transformadas com a construção (pAd5-Blue ORF2); as colônias recombinantes foram selecionadas e o material genético multiplicado. Este plasmídeo foi linearizado pela enzima *PacI* e transfectado em células da linhagem HEK 293. A expressão da proteína pelo adenovírus recombinante em células de mamífero foi confirmada por imunoperoxidase em monocamada, *Western blotting* e imunofluorescência. Duas doses de vírus purificado e titulado (2×10^8 TCID₅₀/50 μ L) foram inoculadas em camundongos BALB/c para verificação da resposta imune. Soro e baço dos animais foram coletados para ensaios de resposta humoral e celular, respectivamente. Apesar de não esperarmos níveis altos de anticorpos produzidos pelo adenovírus recombinante, a resposta imune celular foi eficaz uma vez que a eficiente expressão de mRNA de INF- γ e consequentemente, proliferação de linfócitos T CD8⁺ ratificou o indício de um candidato vacinal promissor contra o PCV2.

ABSTRACT

Chiarelli Neto, Orlando, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009.
Construction and characterization of a recombinant adenovirus that express capsid protein of PCV2. Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Committee members: Francisco Murilo Zerbini Júnior, Juliana Lopes Rangel Fietto e Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo

The porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of those swine circovirose, multifactorial disease in swine and emerging national and involving different clinical presentations. The PCV2 and ORF2 has the coding of the protein and characterized as capsidal immunogenic. Our goal thus was to construct a system of gene expression of the ORF2 of PCV2 in an adenovirus vector. The ORF2 was been amplified by the polymerase chain reaction (PCR) and cloned into vector pGEM T-easy. Cells of *Escherichia coli* DH5a were transformed with the recombinant plasmid (pGEM-ORF2) and amplified genetic product. The cloning was confirmed by sequencing and a test of the restriction enzyme *EcoRI*. Confirmed the cloning, the plasmid was cleaved by restriction enzyme *NheI* and *AclI*, releasing the ORF2. This segment was cloned in the vector-Blue pAD5 previously cleaved with the enzymes *XbaI* and *ClaI*. Cells of *E. coli* TOP10 were transformed with the construction (pAd5 Blue-ORF2), the recombinant colonies were selected and the genetic product multiplied. This plasmid was cleaved by the enzyme *PacI*, linearized and transfectated in HEK 293 cells. The confirmation of viral expression *in vitro* was detected by Immunoperoxidase Monolayer Assay, *Western Blotting* and Immunofluorescence Assay. The purified viruses were tited in 2×10^8 TCID₅₀/50 μ L. Two doses of purified and tited virus (2×10^8 TCID₅₀/50 μ L) were inoculated into BALB/c animals to check the immune response. Serum and spleen of animals were collected for testing the humoral and cellular response respectively. Although not expect high levels of antibodies produced by recombinant adenovirus, the cellular immune response has been effective since the efficient expression of mRNA for INF- γ and, consequently, proliferation of cells T CD8⁺ confirmed the indication of a promising candidate vaccine against the PCV2.

1. INTRODUÇÃO

O Porcine circovirus 2 (PCV2) é classificado dentro da família *Circoviridae* (Lukert et al., 1995) com características de ser um vírus pequeno não envelopado contendo um genoma de DNA fita simples circular e reconhecido como um patógeno de suíno a partir da década de 90. O PCV2 tem sido associado a um conjunto de síndromes denominadas circovirose suína.

A PMWS é uma doença emergente de suínos, caracterizada clinicamente por dispnéia progressiva, aumento dos nódulos linfáticos e patologicamente caracterizada por uma ampla extensão de lesões inflamatórias que incluem, freqüentemente, pneumonia intersticial, hepatite, nefrite intersticial, pancreatite e linfadenite linfocítica e ou granulomatosa (Clark, 1997; Harding, 1997; Harding e Clark, 1997). Além da PMWS, estão associadas ao PCV2, a síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS), pneumonia necrotizante e proliferativa (PNP), miocardite perinatal e falhas reprodutivas (Allan e Ellis, 2000).

O advento da terapia gênica e seu potencial para gerar tratamentos efetivos no combate a doenças têm chamado a atenção de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento. A utilização de vetores virais está associada com a produção de vacinas mais eficientes e seguras. Busca-se como características ideais de um vetor, a fácil aplicação, a ampla capacidade de clonagem e a sua não imunogenicidade. Ao longo das duas últimas décadas, vários modelos virais vêm sendo estudados para esse propósito, destacando-se entre eles, os poxvírus, herpesvírus e adenovírus.

Os adenovírus têm potencial para o uso como vetor para a produção de vacinas recombinantes. Os adenovírus apresentam algumas vantagens como vetor, entre elas a capacidade de expressarem altos níveis de antígenos em uma grande variedade de células, incluindo células musculares epiteliais, neuronais e macrófagos, independente da fase celular. Além disso, o seu DNA pode ser mantido por períodos relativamente longos, na forma de epissomos, não sendo incorporados ao DNA do hospedeiro. Ele também pode ser utilizado em várias espécies animais, pois se multiplicam em altos níveis. Os adenovírus têm sido bem estudados e são, relativamente, fáceis de manipular; além de serem seguros (Prevec et al., 1989; Russel, 2000).

Os adenovírus vêm sendo amplamente utilizados como vetor para vacinas recombinantes nas últimas décadas. Dentre elas, estão as vacinas contra vírus da hepatite B (Chengalvala et al., 1994), vírus da imunodeficiência símia (Caravokyri et al., 1993), vírus da raiva (Prevec et al., 1990), vírus da parainfluenza bovina 3 (Becker e Darai, 1995), herpesvírus bovino tipo 1 (Mittal et al., 1996), coronavírus bovino (Yoo et al., 1992), vírus da diarréia viral bovina (Elahi et al., 1999), vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (Torres et al., 1995) e vírus da estomatite vesicular (Prevec et al., 1989), entre outras.

Hasslung (2003) mostrou que um dos cinco oligonucleotídeos (ODNs) selecionados do genoma do PCV2 continha motivos CpG e exibiam uma atividade inibitória na produção de interferon alfa (INF- α) por células mononucleares sanguíneas periféricas, e que os outros quatro motivos CpG possuíam efeitos estimulatórios na produção de IFN- α . Porém, Chang e colaboradores (2005) constataram *in vitro* o aumento na produção de IFN- α em macrófagos alveolares. Sipos e colaboradores (2004) verificaram um decréscimo na produção de IFN- γ em células periféricas sanguíneas.

Vários autores já verificaram a ação antiviral dos interferons *in vivo*. Moraes e colaboradores (2003) avaliaram a ação antiviral dos INF- α em suínos infectados com o vírus da febre aftosa e Chinsangaram e colaboradores (2002) demonstraram uma diminuição no grau das lesões de suínos tratados com o sistema de adenovírus expressando o INF- α e desafiados com o vírus da febre aftosa.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), no Laboratório de Virologia localizado no setor de Medicina Veterinária Preventiva e de Saúde Pública (DVT) e no Laboratório de Experimentação Animal localizado no Departamento de Nutrição e Saúde, todos na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Vírus e células

Células renais de suíno (PK15), livres de PCV2, foram inicialmente cultivadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5% em Meio Essencial Mínimo (MEM) enriquecido com piruvato 1,0 M e antibióticos streptomomicina (1,00 g/L), penicilina (0,75 g/L) e suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil). As células foram inoculadas com o isolado de Minas Gerais (DQ364650) e após incubação por 24 horas, as células inoculadas com o PCV2 foram tratadas com D-glicosamina 300 mM (Sigma, Alemanha) e incubadas por 48 horas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Após duas passagens em cultivo celular, os DNAs totais das células inoculadas com o PCV2 e das células livres de PCV2 foram extraídos utilizando o Kit *Genomic DNA Purification from Tissue* (Promega, EUA).

2.2. Amplificação da ORF2, clonagem e sequenciamento

A amplificação do fragmento de DNA viral de 702 bp correspondente à região codificadora da ORF2 foi realizada pela técnica da PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), utilizando *primers* específicos: FCAP 5'-CGGCTAGCCGATGACGTATCCAAG-3' (*Forward*) e RCAP 5'-GACGCGTCGTTAGGGTTTAAGTG-3' (*Reverse*), construídos a

partir da sequência do genoma do isolado brasileiro de PCV2 (DQ364650) depositada no *GenBank*. A mistura da reação para o ensaio da PCR foi constituída de tampão de reação 10X (Tris-HCl 10mM, pH 9,0 e KCl 50mM, MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs 10 mM, 0,3M de cada oligonucleotídeo e Taq DNA polimerase 2,5U/μL. Após a adição do DNA (2 μL), a mistura foi transferida para um termociclador (MJC, Inc. PTC-100, EUA). A reação da PCR consistiu de uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e a 72°C por 1 min. A etapa final de extensão foi de 10 minutos a 72°C. O produto da PCR foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Figura 1), utilizando o *Kit pGEM -T - Easy*TM (Promega, EUA) conforme manual do fabricante. Os DNAs plasmidiais foram purificados utilizando o *Kit Wizard ® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA) e, em seguida, os mesmos foram submetidos à reação de sequenciamento de acordo com Sanger e colaboradores (1977), em aparelho MegaBACE 1000 (GE Healthcare, EUA), utilizando os *primers* M13 *Forward* e *Reverse*.

2.3. Minipreparação de DNA plasmidial

Após a clonagem do material amplificado (ORF2) no vetor pGEM e transformação em células de *Escherichia coli* DH5α competentes, segundo Sambrook e colaboradores (1989), as colônias recombinantes (transformadas com a construção pGEM-ORF2) foram selecionadas pela marca de resistência à ampicilina e pela alfa-complementação, em meio seletivo (LB/ampicilina/X-gal/IPTG). O DNA plasmidial destas colônias foi extraído pelo método de minipreparação de DNA plasmidial também descrito por Sambrook e colaboradores (1989), com algumas modificações.

O plasmídeo pAd5-Blue (Figura 1) foi selecionado e concedido (Moraes et al., 2001) neste trabalho como vetor de expressão da ORF2 do PCV2.

Células de *Escherichia coli* DH5α transformadas com o plasmídeo pAd5-Blue foram multiplicadas em meio seletivo contendo canamicina (30 μg/mL) e mantidas durante 14 horas

sob agitação (200 RPM) a 37°C. O DNA plasmidial também foi extraído utilizando o método de minipreparação de DNA plasmidial descrito anteriormente.

2.4. Digestão com enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais

A confirmação da clonagem do fragmento correspondente à ORF2 no vetor pGEM foi realizada por um ensaio de restrição com a enzima *EcoRI* a partir do material extraído na minipreparação de DNA plasmidial. Esta enzima atua no clone (pGEM-ORF2) clivando as extremidades e na parte interna do inserto (ORF2), produzindo fragmentos de 402 pb e 318 pb que foram identificados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O produto da minipreparação do DNA plasmidial também foi clivado pelas enzimas *AclI* e *NheI*, liberando o fragmento contendo a ORF2 (702 pb) para a sua posterior clonagem no vetor de adenovírus. O plasmídeo pAd5-Blue, por sua vez, foi submetido a um ensaio de restrição com as enzimas *ClaI* e *XbaI*, liberando um fragmento correspondente aos genes *lacZ* e *amp*, produzindo extremidades compatíveis às extremidades de DNA da ORF2.

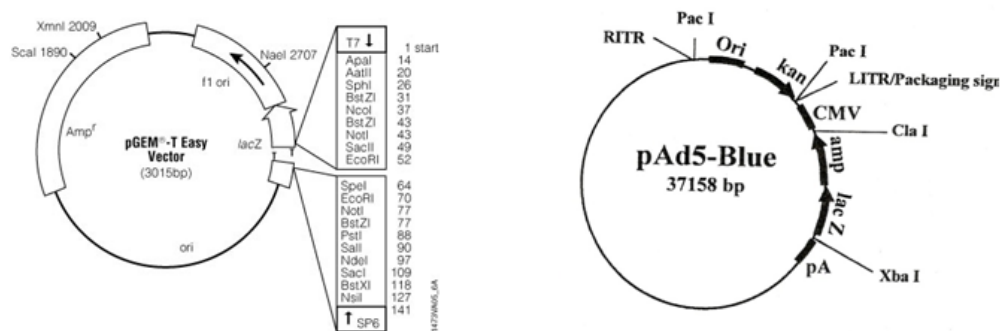


Figura 1: Mapa físico do vetor pGEM-T Easy e vetor pAd5-Blue. O vetor pGEM-T Easy foi utilizado para clonagem do fragmento correspondente a ORF2 do PCV2. O vetor pAd5-Blue foi utilizado para expressão da proteína do capsídeo do PCV2 uma vez que este vetor possui um promotor forte CMV, reconhecido pela maquinaria de transcrição em célula de mamífero, e a cauda poli adenilada.

2.5. Construção dos vetores de adenovírus recombinantes

A ORF2 foi clonada no vetor pAd5-Blue a partir da reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase. O plasmídeo construído (pAd5-Blue ORF2) (Figura 2) foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* TOP10 eletrocompetentes. As células foram transformadas utilizando cubetas de eletroporação Bio-Rad (EUA) com espaçamento de 0,2 cm e aplicando um pulso elétrico de 25 μ F, 2,5 kV e 200 ohms, durante 2,5 a 4 milissegundos. Um ensaio controle, consistindo na transformação das células de *E. coli* TOP10 com o vetor pAd5-Blue vazio também foi realizado.

As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo contendo canamicina e X-gal. As colônias recombinantes foram selecionadas e o DNA plasmidial (pAd5-Blue ORF2) foi purificado utilizando o Kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA).

A confirmação da construção do vetor de expressão (pAd5-Blue ORF2) foi realizada por um ensaio de restrição com a enzima *HindIII*. Este ensaio foi realizado utilizando a metodologia descrita anteriormente e um vetor não recombinante (pAd5-Blue), clivado com as enzimas *ClaI* e *XbaI*, foi selecionado como controle.

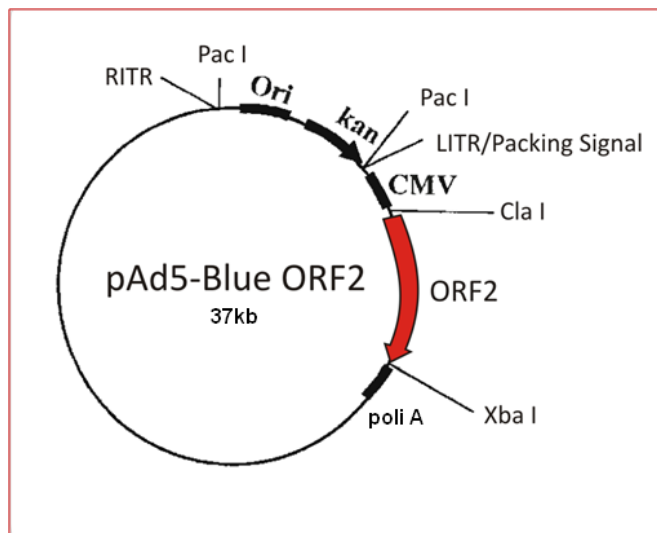


Figura 2: Mapa físico do vetor pAd5-Blue ORF2. Vetor pAd5-Blue de 37 kb com a ORF2 do PCV2 utilizada para expressão do proteína do capsídeo do PCV2.

2.6. Transfecção das células HEK 293 com o DNA viral recombinante

Vetores pAd5-Blue-ORF2, denominados clone #2 e clone #8, foram linearizados em um ensaio de restrição com a enzima *PacI*. Quantidades de 3 a 3,5 μg de DNA plasmidial linearizados foram transfectadas utilizando o Kit *Lipofectamine TM 2000* (Invitrogen, EUA) em células HEK 293 cultivadas em monocamadas, por 24h, em placas de seis poços. As células foram observadas diariamente e as placas virais foram coletadas e repassadas a garrafas T 25 cm^3 contendo células HEK 293 com 60% de confluência. Após ter alcançado efeito citopático, as células foram congeladas e descongeladas 3 vezes e congeladas a -70°C em tampão fosfato (PBS) adicionado de 5 mM de cálcio e magnésio (PBS^{++}) na proporção de 5 : 1 volumes, respectivamente.

2.7. Verificação da replicação viral por *Western blotting*

Após a inoculação dos adenovírus recombinantes #2 e #8 em células HEK 293, bem como a inoculação do PCV2 tipo selvagem (provenientes de quarta passagem) em células

PK15 livres, as células foram mantidas em estufa sob atmosfera de 5% CO₂ e temperatura de 37°C. Quarenta e oito horas de incubação foi o suficiente para a replicação e a montagem das partículas virais, as quais foram lisadas em tampão de lise. Aos lisados celulares foram adicionados DTT e tampão de amostra sob fervura por 5 minutos e a mistura aplicada em gel SDS-PAGE 15%. Após a corrida, montou-se o cassete para a técnica da *Western blotting*. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™- C 27 extra (Amersham) em tampão de transferência (Tris-HCl 20 mM, glicina 190 mM, etanol 20%, pH 8,3) usando o sistema de transferência Mini Trans-blot (Bio-Rad) a 100 V por 2 horas. Em seguida, a membrana foi corada por 10 min com solução de Ponceau (Vetec), lavada com água ultra pura destilada e então bloqueada com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (Tris 25 mM, 0,9% de NaCl 0,1% de Tween-20, pH 8,0) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação de 50 RPM. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário de coelho anti-PCV2/ORF2/CAP (1:2.000) produzido pelo Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA). Depois de três lavagens de 5 min com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:8.000) (Sigma) por 1 hora. A membrana foi novamente lavada por 3 vezes a 5 minutos e foi revelada com DAB 0,1% (Tetracloridrato de 3,3'- diaminobenzidina) (Sigma) na presença de tampão Tris 50 mM, pH 7,6 e 0,1% de peróxido de hidrogênio 30 volumes. A reação de revelação foi paralisada mergulhando a membrana em recipiente com água destilada.

2.8. Ensaio da imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA)

Uma suspensão de células HEK 293 foi preparada para uma placa de 96 poços. Cem µL da suspensão celular (40000 células por poço) com 5% de soro fetal bovino foram adicionados em cada poço com auxílio de uma pipeta multicanal. A placa foi incubada em

estufa de CO₂ a 37°C por 20 horas e submetida a duas lavagens com PBS1X para inoculação viral. Foram adicionados 50 µL de adenovírus recombinante, provenientes de quarta passagem, em cada poço e incubada por 1 hora em estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente, 100 µL de DMEM com 5% de soro fetal bovino foram adicionados em cada poço e a placa incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas. Depois desse tempo, o meio foi descartado e 50 µL de uma solução de acetona: metanol (1:1) foi adicionado à placa para fixação do material durante 10 minutos e a solução foi retirada para a secagem da placa. A diluição do soro primário (anticorpo primário de coelho anti-PCV2/ORF2/CAP) foi feita em PBS 1X com 2% de albumina (diluição 1:300). Foram adicionados 50 µL do soro primário em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora em estufa de 5 % CO₂ a 37°C. A placa foi lavada duas vezes com 100 µL de solução de lavagem para incubação em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora com 50 µL de anticorpo secundário (anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase) (Sigma EUA) na diluição de 1:1.000. A placa foi lavada por mais duas vezes com 100 µL de solução de lavagem para posterior adição da solução de revelação. Foram adicionados 50 µL de diaminobenzidina (DAB) em cada poço e a placa incubada por aproximadamente 15 minutos. A solução de revelação foi retirada e a placa foi lavada duas vezes com 100 µL de PBS 1X, com posterior adição de PBS 1X para realização da leitura no microscópio invertido.

2.9. Purificação de adenovírus recombinantes e titulação das progênes

Para a purificação do adenovírus recombinante, 25 garrafas T 150 cm³ de células HEK 293 com 80% de confluência foram inoculadas com 5 mL de suspensão viral (clone #8) após duas passagens em cultura celular. Para aumentar a adsorção viral, fez-se uma movimentação cuidadosa na horizontal (rocamento) de 1 minuto, nos intervalos de 15 minutos durante 1 hora, completando o volume de cada frasco para 20 mL. Após 48 horas de inoculação, observou-se o início do efeito citopático e a monocamada de células foi retirada e

centrifugada a 3000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi estocado a 4°C e o sedimento formado foi homogeneizado em solução de PBS⁺⁺ acrescido com detergente nonil-fenoxilpolietoxietanol (NP40) a 0,5% e congelado a -70°C. Após congelamento e descongelamento do agregado vírus-células, o material foi centrifugado duas vezes salvando o sobrenadante. Um volume de 4,15 mL de suspensão viral em gradiente de cloreto de cézio nas densidades de 1,4 e 1,2 g/mL foi purificado por meio de ultracentrifugação em gradiente descontínuo a 23000 x g (rotor SW40). A banda parcialmente purificada foi acrescida de tampão TE nas proporções 1:1 e ultracentrifugada em gradiente contínuo de cloreto de cézio a 26000 x g (rotor SW40). Após a ultracentrifugação, a porção correspondente à banda viral foi dialisada em Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 e cloreto de magnésio 10 mM em agitação a 4°C, tomando-se o cuidado de mudar a solução em 3 intervalos durante 1 hora. Aproximadamente um mililitro de vírus foi misturado com 0,285 mL de glicerol 90% e congelado a -70 °C. Os vírus foram, então, titulados pelo método de dose infecciosa para cultura de tecidos com 2×10^8 TCID₅₀/50µL.

2.10. Imunofluorescência da proteína expressa pelos adenovírus purificado

Um total de 4×10^4 células HEK 293 foram adicionadas em cada poço da lâmina sob incubação a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas, 100 µL do adenovírus purificado na diluição (1:50) foram adicionados em 7 poços, sendo o oitavo utilizado como controle negativo. Após a primeira hora de inoculação, a reação foi paralisada no primeiro poço da lâmina utilizando 300 µL de PBS 1X e formol 10%. Foi realizado o mesmo procedimento nos demais poços com os respectivos tempos. As lâminas foram lavadas três vezes com 500 µL de PBS 1 % em cada poço para posterior fixação com formaldeído 4% por 10 minutos. Foram feitas três lavagens sucessivas para permeabilização com 200 µL de PBS 1X Triton X-100 a 0,1 % por 10 min a 25°C. As células foram lavadas três vezes para posterior bloqueio com 200 µL de solução de BSA 3% Triton X-100 0,1 % por 1 hora a 37 °C. Após três lavagens

com 500 μL de PBS 1%, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-PCV2/ORF2/CAP produzido pelo LIMA, na diluição de 1:50 em um volume de 100 μL /poço (3 horas/ 37 °C). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com 500 μL /poço de PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC na diluição 1:100 (Sigma EUA) em um volume de 100 μL /poço (3 horas/ 37 °C). As lâminas foram lavadas por mais quatro vezes com 500 μL de PBS 1X em cada poço, sendo que na quarta lavagem utilizou-se água ultrapura autoclavada. Por fim, foram adicionados 5 μL de sacarose na lâmina e a mesma foi coberta com uma lamínula para visualização no microscópio de fluorescência Olympus® BX60.

2.11. Imunização dos camundongos e avaliação da resposta imunológica

Vinte e cinco camundongos BALB/c fêmeas com cinco semanas de idade provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram divididos em cinco grupos e inoculados via subcutânea, conforme certificação da Comissão de Ética do DVT/UFV processo nº 12/2009 (em anexo), estando de acordo com o código de ética profissional do Médico Veterinário, com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente.

Os animais dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram administrados com uma dose de 100 μL de PBS 1X (pH 7,4), saponina (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), adenovírus recombinante e PBS 1X (2×10^8 TCID₅₀/50 μL), adenovírus recombinante e saponina (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ + 2×10^8 TCID₅₀/50 μL) e vacina comercial Circovac® (100 μL) nos dias zero e quatorze, respectivamente. O sangue dos animais foi coletado via ocular para obtenção do soro um dia anterior ao início da imunização e 14, 28 e 45 sendo que neste último, os animais foram eutanasiados para a realização dos ensaios moleculares e imunológicos.

2.12. Ensaio de linfoproliferação celular

Camundongos dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram eutanasiados e tiveram o baço removido assepticamente e divulsionado em EDTA 200mM para a obtenção de células esplênicas totais. Essas células foram lavadas com meio RPMI 1640, suplementado com estreptomicina 1,00 g/L e penicilina 0,75 g/L, centrifugadas a 250 RPM por 10 minutos a 4°C e incubadas por 4 minutos com tampão de lise (nove partes de cloreto de amônia a 0,16 M e uma parte de Tris-HCl a 0,17 M) a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas e ressuspensas para uma concentração de 1×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, as células foram adicionadas em placa de 96 poços (100µL/poço) e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas utilizando os tratamentos com meio RPMI suplementado com 5% de SFB (controle negativo), com o estímulo de ConA (2µg/mL) usado como controle positivo e com a proteína recombinante do capsídeo do PCV2 purificada em coluna de afinidade, na concentração de 2µg/mL. Após o período de incubação, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 200 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) na concentração de 5mg/mL em cada poço. Após quatro horas de incubação a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, foi retirado cuidadosamente o MTT metabolizado e foram adicionados 200µL de DMSO observando a formação do metabólito roxo (formazan) e, em seguida, a placa foi lida na absorvância de 550 nm em um espectrofotômetro para detecção da proliferação celular.

2.13. Avaliação da transcrição das citocinas IL-4 e INF-γ

Para avaliação das interleucinas *in vitro*, foram utilizadas células do baço de animais eutanasiados de todos os grupos. As células foram adicionadas em uma placa de 24 poços, distribuídas em duas repetições por animal com os tratamentos contendo meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB (controle negativo) e a proteína do capsídeo do PCV2

purificada, na concentração de 2µg/mL.

O cDNA foi produzido a partir de 4µg de mRNA extraído pelo método de Trizol, proveniente das células do baço submetidas aos tratamentos com meio RPMI e com a proteína recombinante do capsídeo do PCV2. A partir do cDNA produzido, foi realizada a PCR em tempo real para a quantificação relativa utilizando *primers* específicos para β -actina (controle endógeno), IL-4 e INF- γ , utilizando o kit *Master Mix Syber Green*® (Fermentas).

As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços. Cada reação consistiu de um volume final de 25µL contendo 12,5 µL de *Master Mix Syber Green*®, 10,0 µL dos *primers* correspondentes na concentração de 1µM e 2,5 µL do produto de cDNA utilizando o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 56°C por 60 segundos e 72°C por 2 minutos. Os resultados foram analisados com o *software 7500 System* versão 1.4. Em cada curva de amplificação, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi calculado, representando o número de ciclos da PCR em que a fluorescência do repórter foi detectável. A análise das amostras foi realizada em duplicata e todos os Cts analisados representaram a média do Ct de cada amostra.

2.14. Avaliação de marcadores de superfície por citometria de fluxo

No intuito de caracterizar a população de linfócitos T, análises de expressão de marcadores de superfície (CD4⁺ e CD8⁺) foram realizadas em células recuperadas do baço de camundongos provenientes dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5. Inicialmente, as células foram incubadas com Fc-block por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 2µL por 10⁶ células de anticorpos monoclonais anti-CD4-FITC e anti-CD8-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame) e anti-CD44-PE (Invitrogen EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Um volume de 300µL de PBS 1X com formol 1% foi adicionado nas células para posterior leitura no aparelho BD FACS *Calibur - Cell Quest Pro* localizado

no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais sob o auxílio do Professor Luis Carlos Crocco Afonso. Células do baço, isotipos, CD4⁺ (FITC), CD8⁺ (FITC), CD44 (PE) foram utilizados para calibragem do equipamento. Todos o grupos (G1,G2,G3,G4,G5) foram marcados com CD4xCD44 e CD8xCD44 para avaliação da população de células de memória analisadas no software Flow Jo.

2.15. Avaliação da resposta humoral por ELISA indireto

A proteína Cap – PCV2 recombinante purificada e dialisada foi diluída em tampão carbonato 50 mM e pH 9,6 para a obtenção de uma solução com a concentração desejada. Em seguida, 100 µL da solução preparada foram utilizadas para sensibilizar cada poço, sendo a quantidade de proteína recombinante igual a 0,125µg/poço. A placa foi então incubada a 4 °C por cerca de 12 horas. Decorrido este período, a placa foi lavada três vezes com PBS-T (NaCl 0,9 %; Tween-20 a 0,05 %; tampão fosfato 50 mM e pH 7,4) antes que 100 µL do tampão de bloqueio (caseína 3% diluída em PBS-T) fosse adicionado a cada poço. Após incubação de 3 horas a 37°C, foram feitas mais duas lavagens com PBS-T. Em seguida os soros dos animais pertencentes aos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 coletados nos dias 0, 14, 28 e 45, foram diluídos (1:10) e então 100 µL adicionados a cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora e posteriormente lavada por três vezes. O anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase - Upstate) foi devidamente diluído (1:20.000) e 100 µL foram adicionados a cada poço e a placa incubada a 37°C por 1 hora. Finalmente, a placa foi lavada seis vezes com PBS-T e 100 µL da solução que continha o substrato (20 mL de tampão citrato fosfato 100 mM, pH 6,0, 4mg de O.P.D. (o – fenildiaminobenzeno) e 2,5 µL de H₂O₂ 30 volumes) foram adicionados em cada poço, sendo a placa incubada por um período de 15 minutos em local escuro. A reação foi paralisada adicionando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 1:20 e a leitura realizada em leitor de placa a 492 nm.

2.16. Análises estatísticas

As médias dos parâmetros estudados foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o software Graph Pad PRISM 4.00 for WINDOWS

3.11. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Construção do adenovírus recombinante

Primeiro, a ORF2 do PCV2 foi amplificado via PCR (Figura 3) a partir do DNA total de células SK6 infectadas com o PCV2. Após a purificação do produto da PCR correspondente ao fragmento de 720 pb, a ORF2 foi clonado no vetor pGEM-T easy e células de *E. coli* competentes foram transformadas com esta construção (pGEM-ORF2). A clonagem foi confirmada a partir do sequenciamento e da clivagem do DNA plasmidial extraído das colônias recombinantes, pela endonuclease de restrição *EcoRI*, observando-se o padrão de bandas esperados correspondentes aos fragmentos de 402 pb e 318 pb na eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 4).

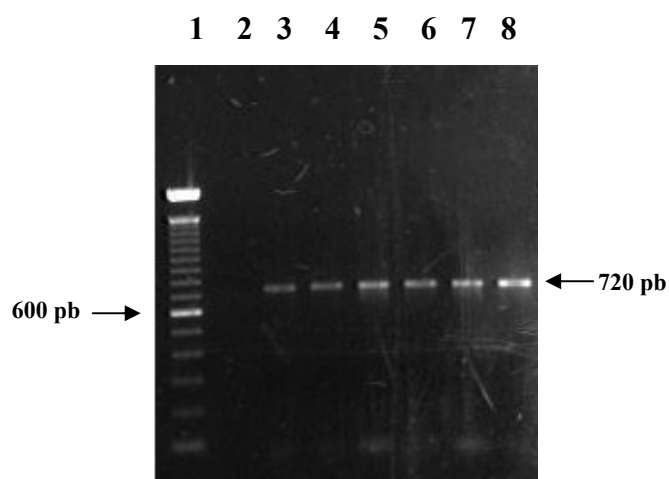


Figura 3: Isolamento da ORF2 pela PCR convencional. Canaleta 1: Marcador de DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL); Canaleta 2: Controle negativo; Canaletas 3 a 7: Produtos amplificados de 720pb correspondente ao DNA/ORF2 do PCV2; Canaleta 8: Controle positivo da reação com o produto da ORF 2 do PCV2.

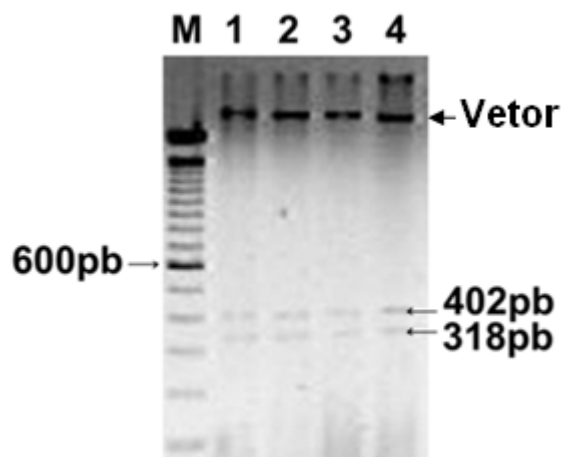


Figura 4: Ensaio de restrição do pGEM-ORF2. Clivagem do plasmídeo pGEM-ORF2 pela enzima de restrição *EcoRI*. Canaleta M: Marcador de DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL); Canaletas 1, 2, 3 e 4: Clones selecionados e confirmados pela clivagem, observados pelos fragmentos de 402 e 318pb.

Os ensaios de restrição do plasmídeo pGEM-ORF2 com as enzimas *NheI* e *AclI* produziram o fragmento de 720 pb correspondente a ORF2 do PCV2, e a clivagem do plasmídeo pAd5-Blue pelas enzimas *ClaI* e *XbaI* linearizam o vetor (Figura 5).

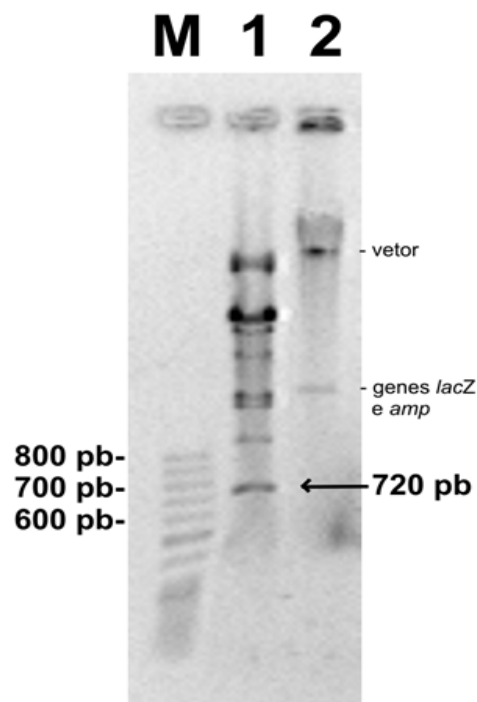


Figura 5: Ensaio de restrição dos DNAs plasmidiais. Canaleta M: Marcador de DNA Ladder 50 pb (Fermentas); Canaleta 1: Produto da clivagem do plasmídeo pGEM-ORF2 pelas enzimas *AcII* e *NheI*, observação do fragmento de 720 pb correspondente à ORF2. Canaleta 2: Produto da clivagem do plasmídeo pAd5-Blue pelas enzimas *ClaI* e *XbaI*, observação do fragmento correspondente ao vetor linearizado e do fragmento correspondente aos genes *lacZ* e *amp*.

O segmento correspondente à ORF2 foi então ligado no vetor pAd5-Blue clivado e linearizado (Figura 6). Após a transformação das células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes com a construção pAd5-Blue ORF2 e extração do DNA plasmidial das colônias recombinantes, a clonagem foi confirmada por um ensaio de restrição com a enzima *HindIII*, observado-se o padrão de bandas esperado (Figura 7).

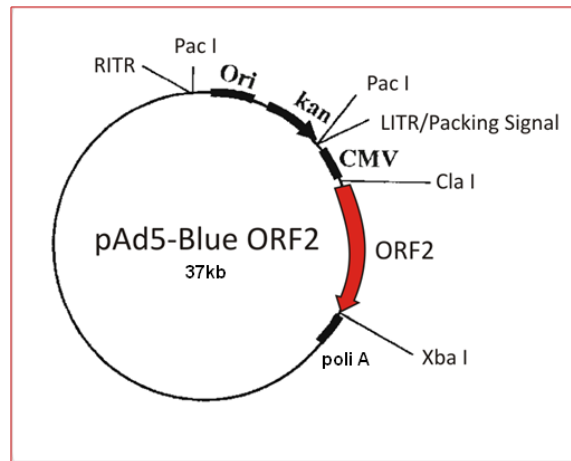


Figura 6: Mapa físico do vetor pAd5-Blue ORF2. Construção do sistema pAd5-Blue ORF2 que codifica a proteína do capsídeo viral do circovírus suíno 2 (PCV2) fusionada ao promotor forte CMV, reconhecido pela maquinaria de transcrição em célula de mamífero, e a cauda poli adenilada, importante para o mecanismo de expressão da proteína do capsídeo do PCV2. Essa construção possui também marca de resistência a canamicina e origem de replicação importantes para clonagens em bactérias.

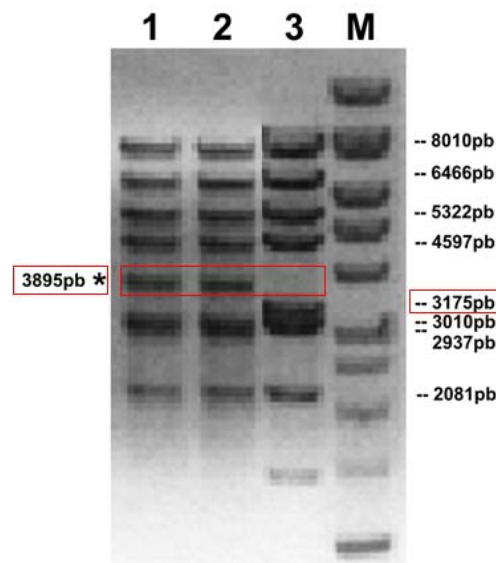


Figura 7: Confirmação da clonagem do fragmento de 720 pb no vetor pAd5-Blue. Clivagem dos vetores de adenovírus pela enzima *HindIII*. Canaleta M: Marcador de DNA Ladder 1 kb (Fermentas); Canaletas 1 e 2: Produto da clivagem do adenovírus recombinante (pAd5-Blue ORF2), observação de um fragmento de 3895 pb (posição marcada com um asterisco) correspondente a região onde foi inserida a ORF2 (702pb). Canaleta 3: Produto da clivagem do plasmídeo pAd5-Blue clivado pela enzimas *ClaI* e *XbaI*, mostrando o padrão de bandas na ausência do fragmento *ClaI/XbaI* do genoma do vírus.

3.2. Transfecção em células HEK 293

Após a confirmação da construção, dois clones foram selecionados e linearizados por um ensaio enzimático com a enzima *PacI*. Posterior a linearização dos vetores pAd5-Blue ORF2, estes foram utilizados na transfecção de células da linhagem HEK 293. As células foram observadas diariamente e as placas virais coletadas quando visíveis normalmente, 4 a 8 dias após a transfecção. As placas foram individualmente selecionadas para infectar células HEK 293 cultivadas com confluência de cerca de 60%.

3.3. Expressão da proteína *in vitro*

A partir dos ensaios de *Western blotting* (Figura 8) e Imunoperoxidase (IPMA) (Figura 9) realizado em duas repetições, foi possível detectar a expressão da proteína do capsídeo viral do PCV2 (codificada pela ORF2) em cultura de células HEK 293 infectadas com o adenovírus recombinante não purificado. Esses resultados indicam que o sistema de expressão construído é funcional, sendo capaz de expressar a proteína do capsídeo do circovírus suíno 2.

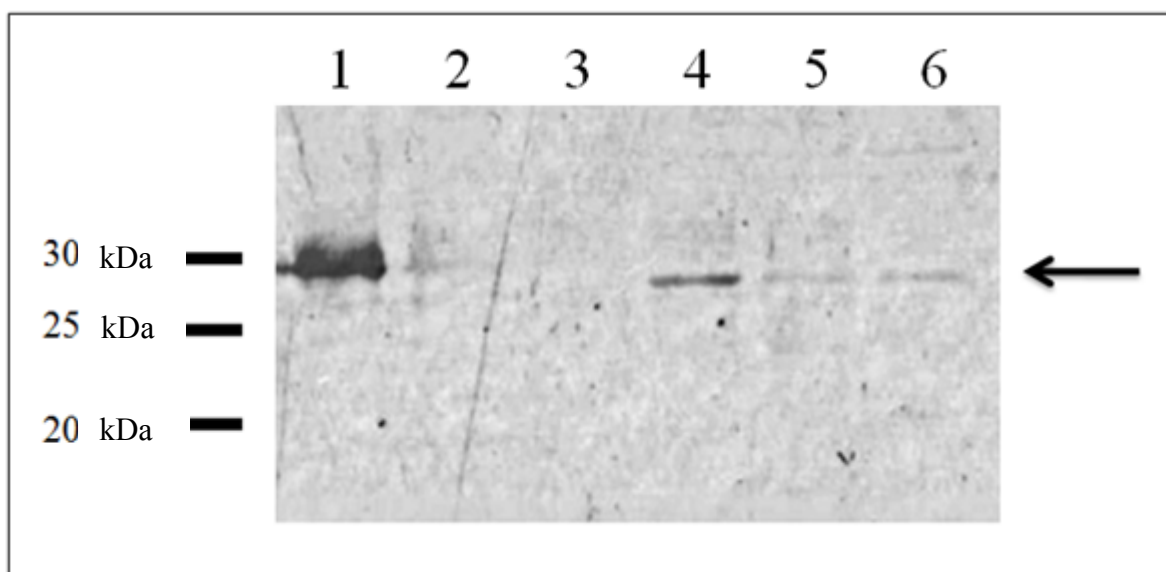


Figura 8: Expressão da proteína do capsídeo do PCV2 por *Western blotting* em células HEK 293 infectadas com os adenovírus recombinantes. Canaleta 1: Proteína do capsídeo do PCV2 purificada usada como controle positivo. Canaleta 2 e 3: Células PK15 livres de PCV 2 e células HEK 293 livres de PCV 1 e PCV 2 e adenovírus recombinante, respectivamente. Canaleta 4: Proteína do capsídeo do PCV2 expressa pelas células PK15 infectadas com PCV1 e PCV2. Canaletas 5 e 6: Proteína do capsídeo do PCV2 expressa pelos adenovírus recombinantes #2 e #8 (indicada pela seta), respectivamente.

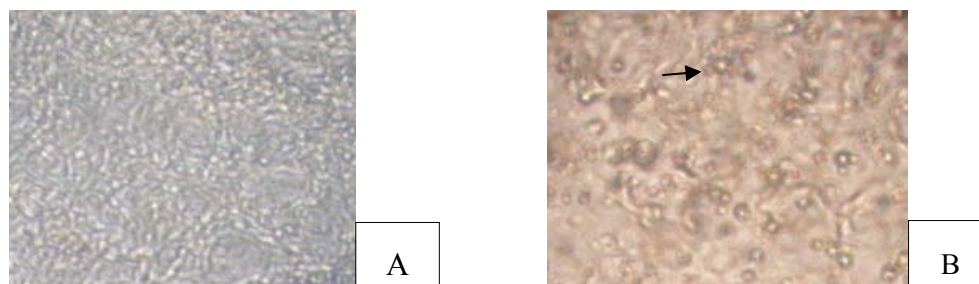


Figura 9: Ensaio de imunoperoxidase em monocamada (IPMA). O controle negativo (A) indica células HEK293 livres de PCV e adenovírus recombinante. As células HEK293 (B) marcadas indica a proteína do capsídeo do PCV2 expressa pelo adenovírus recombinante. A marcação indicada em vermelho indica a expressão da proteína do capsídeo do PCV2 em sistema *in vitro* (ver seta). Visualização em microscópio invertido com um aumento de 100X.

3.4. Avaliação da expressão da proteína do capsídeo em células HEK 293 transfectadas com adenovírus recombinante purificado

Após a purificação do adenovírus recombinante utilizando ultra centrifugação em gradiente de cloreto de cézio e diálise, o vírus purificado foi titulado pelo método de dose infecciosa para cultura de tecidos com 2×10^8 TCID₅₀/50μL e submetido a técnica de imunofluorescência (IFA). A partir dos ensaios da IFA (Figura 10) foi possível detectar a expressão rápida da proteína do capsídeo viral do PCV2, em cultura de células HEK 293 infectadas com o adenovírus recombinante purificado. Estes resultados indicam que o sistema é funcional em cultura celular quando administrado na forma purificada, evidenciado na Figura 10, por meio de uma eficiente expressão da proteína do capsídeo do circovírus suíno 2 após duas horas de inoculação com o adenovírus recombinante purificado.

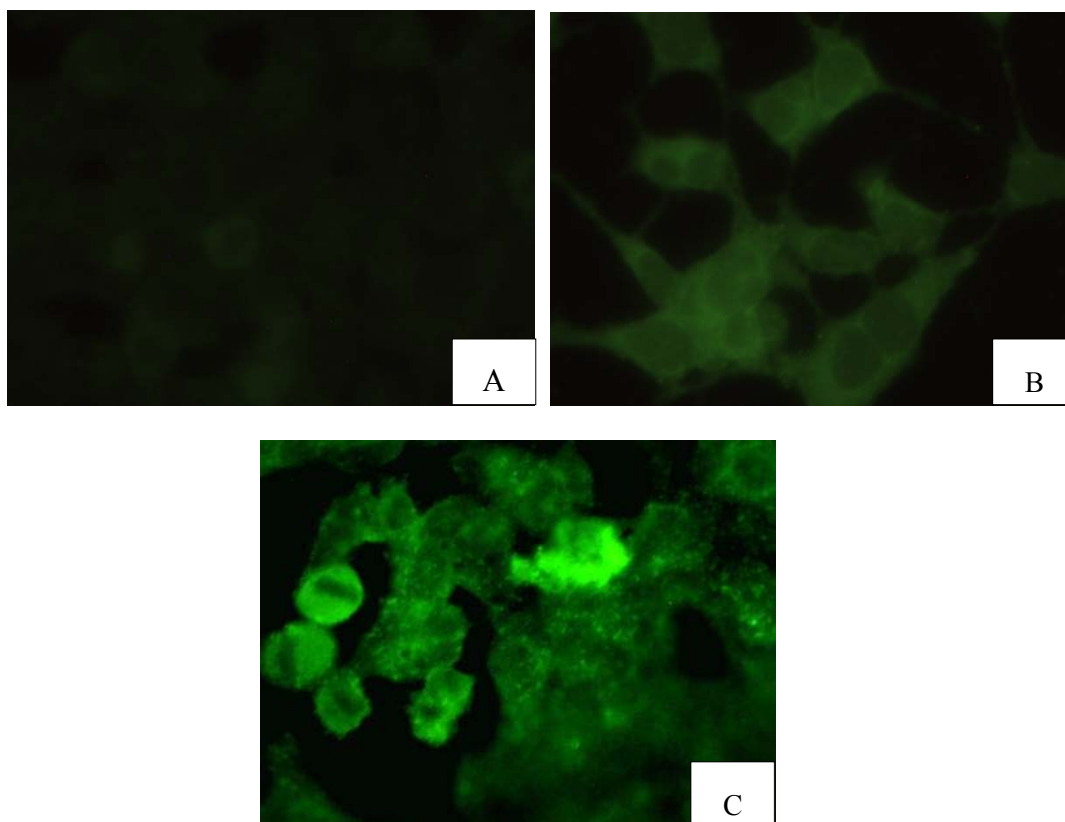


Figura 10: Imunofluorescência de células HEK 293 infectadas com adenovírus recombinante purificado. O controle negativo (A) não mostra fluorescência. Uma fluorescência fraca é observada na imagem B com um tempo de 1 hora de incubação com o vírus purificado. A imagem C apresenta uma forte fluorescência com apenas 2 horas de incubação com o adenovírus purificado. Visualização realizada em microscópio invertido com um aumento de 400X.

3.5. Avaliação do potencial imunogênico do candidato vacinal em animais

O experimento de proliferação celular foi realizado em duas repetições utilizando 5µg/mL ou 2µg/mL de proteína Cap-PCV2 e as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 550 nm.

As células do baço submetidas aos tratamentos com o meio RPMI 1640 a 5% de SFB e submetidas ao tratamento com Concanavalina A (ConA) apresentaram uma maior proliferação em relação ao grupo administrado com a proteína recombinante do capsídeo do PCV2. A proliferação com o meio RPMI 1640 foi similar em todos os grupos. A proliferação com a ConA apresentou proliferação elevada. Por outro lado, o resultado do tratamento com a proteína do capsídeo do PCV2 purificada mostrou não proliferação celular em comparação

com o controle meio RPMI 1640. Esse resultado caracteriza a ocorrência de morte celular quando as células foram tratadas com a proteína do capsídeo recombinante purificada conforme ilustrado pela linha tracejada (Figura 11).

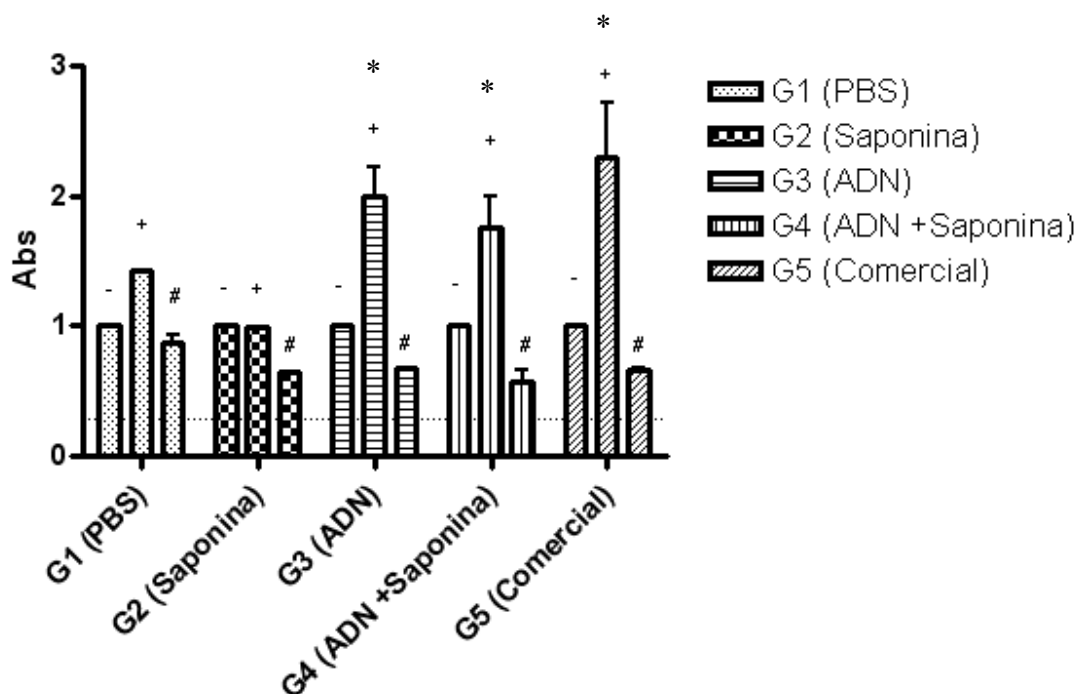


Figura 11: Linfoproliferação das células esplênicas dos camundongos imunizados. Ensaio de linfoproliferação utilizando os tratamentos com o meio RPMI 1640 a 5% de soro fetal bovino (-), Concanavalina A a 5µg/mL (+) e a proteína recombinante do capsídeo do PCV2 a 5µg/mL purificada (#). A linha pontilhada representada no gráfico corresponde aos poços sem a monocamada celular. O asterisco (*) indica significância estatística de $P < 0,05$.

3.6. Dosagem de citocinas

Após a indução das células de baço dos animais vacinados com a proteína do capsídeo do circovírus suíno 2 purificada, a transcrição dos mRNAs responsáveis pela expressão de interferon γ (INF- γ) e interleucina 4 (IL-4) dos grupos inoculados com o adenovírus recombinante (ADN-Cap), adenovírus recombinante mais saponina (ADN-Cap+SAP) e vacina comercial, foi mensurada por meio da quantificação relativa utilizando a PCR em tempo real em duas repetições. A reação da PCR em tempo real evidenciou uma elevada expressão do mRNA codificante da citocina INF- γ no grupo ADN-Cap e não expressão da citocina IL-4 comparado com os demais grupos (Tabela 1).

TABELA 1. Quantificação relativa das citocinas pela PCR em tempo real. Os números correspondem ao número de vezes em que há aumento na taxa de transcrição do mRNA das amostras em relação ao controle. O estímulo Cap-PUR corresponde a proteína do capsídeo do PCV2 purificada. O estímulo com meio RPMI 1640 corresponde ao estímulo controle.

GRUPOS	ESTÍMULO	INF- γ	IL-4
ADN-Cap	Cap-PUR	159,83	0
ADN-Cap+SAP	Cap-PUR	0,01	0
COMERCIAL	Cap-PUR	3,06	0

GRUPOS	ESTÍMULO	INF- γ	IL-4
ADN-Cap	RPMI 1640	0,04	0
ADN-Cap+SAP	RPMI 1640	0	0
COMERCIAL	RPMI 1640	0,01	0,01

3.7. Citometria de fluxo (FACS)

A expressão de marcadores de superfície na população de células de baço de camundongos provenientes dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foi caracterizada para mensurar células CD4⁺, CD8⁺ e CD44.

A Figura 12 mostra inicialmente uma elipse que representa a região referente a população de linfócitos. O grupo G1 representa o grupo controle administrado com PBS 1X, onde os linfócitos T CD4⁺ apresentaram população relativa de 27%. Por outro lado, os linfócitos T CD8⁺ apresentaram população relativa de 9%. Outro grupo controle (G2) administrado com saponina, apresentou população de linfócitos T CD4⁺ de 31% e população de linfócitos T CD8⁺ de 12%. O grupo vacinado com adenovírus recombinante (G3) não apresentou variação estatística da população de células T CD4⁺ em relação ao controle, mas demonstrou variação estatística na população de células T CD8⁺ (13%) em relação ao controle. Por outro lado, o grupo G4 chamou atenção pela baixa população de células T CD4⁺ (20%) em relação ao controle e não mostrou variação estatística na população de células T CD8⁺ em relação ao controle. Já no grupo imunizado com a vacina comercial (G5), a população de células T CD4⁺ apresentou um aumento (30%) em relação ao controle, o que não foi detectado na população de células T CD8⁺.

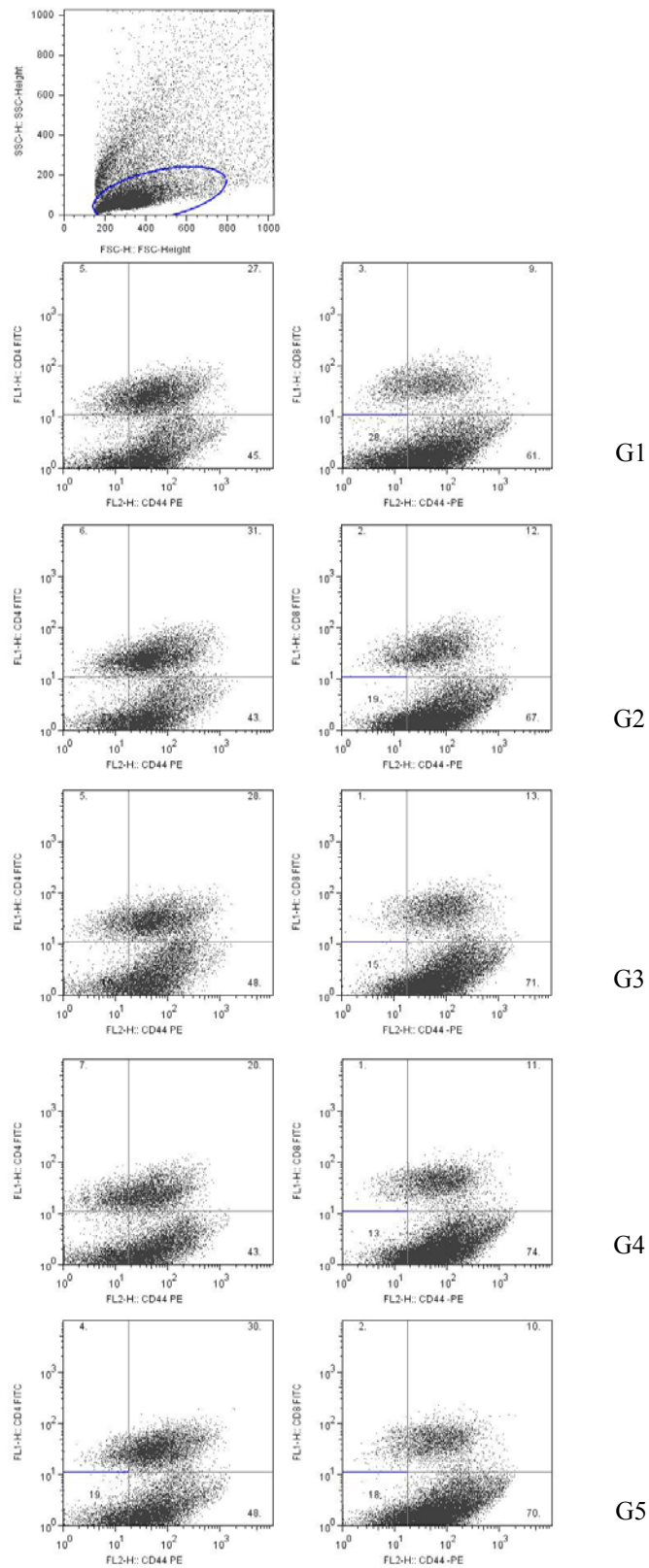


Figura 12: Citometria de fluxo das células esplênicas dos camundongos imunizados. Citometria de fluxo da população de células de linfócitos estimuladas pelas inoculações realizadas nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, utilizando como marcadores os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 marcado com FITC e anti CD44 marcado com PE.

A citometria de fluxo (FACS) mostrou que a vacina comercial estimulou a proliferação da população de linfócitos T auxiliar ($CD4^+$) apesar de $P > 0,05$ (Figura 13A) e, em contrapartida, o adenovírus recombinante estimulou a proliferação da população de linfócitos T citotóxico ($CD8^+$) com $P < 0,05$ (Figura 13B).

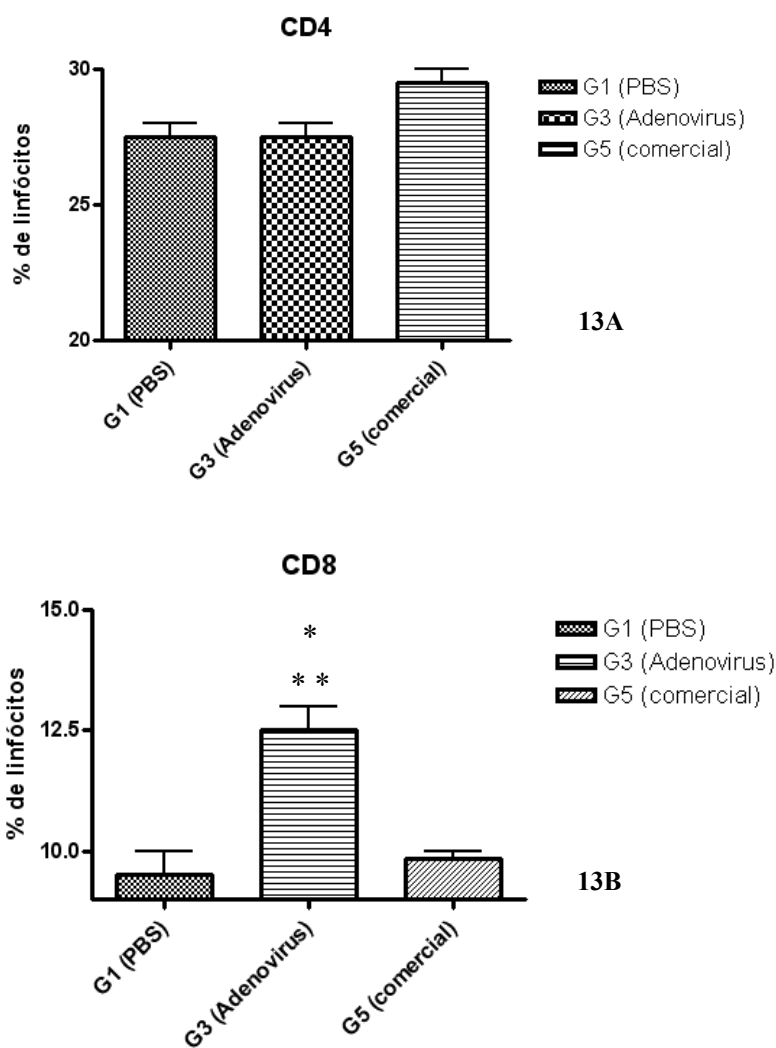


Figura 13: Representação gráfica da população de células de memória. Modelo representado em barras do FACS mostrando os grupos G1 (PBS), G3 (adenovírus recombinante) e o grupo G5 (comercial). O gráfico referente aos linfócitos T $CD4^+$ (13A) mostra a proliferação dessas células dirigidas contra a vacina comercial não ocorrendo significância estatística ($P > 0,05$) com os demais grupos. O gráfico referente aos linfócitos T $CD8^+$ (13B) mostra a proliferação dessas células dirigidas contra o adenovírus recombinante com significância estatística ($P < 0,05$) comparado com o controle PBS (*) e $P < 0,05$ comparado com a vacina comercial (**).

3.8. Resposta humoral

O soro dos animais imunizados foram submetidos a um ensaio imunoenzimático (ELISA) com o intuito de avaliar a produção de anticorpos contra o PCV2. A resposta imune humoral avaliada pelo ELISA indireto e *Westerm blotting* (Figura 14 e 15) demonstrou que a coleta de soro do dia 14 apresentou uma ligeira produção de anticorpos nos grupos dos animais vacinados com uma única dose quando comparadas com os controles. Após a segunda dose, a vacina comercial (G5) apresentou elevada produção de anticorpos conforme observado em amostras de soro coletadas no dia 28 ($P < 0,05$). Por fim, em amostras de soro coletadas no dia 45, o grupo administrado com adenovírus recombinante (G3) apresentou um aumento na produção de anticorpos quando comparado com as coletas anteriores (Figura 14).

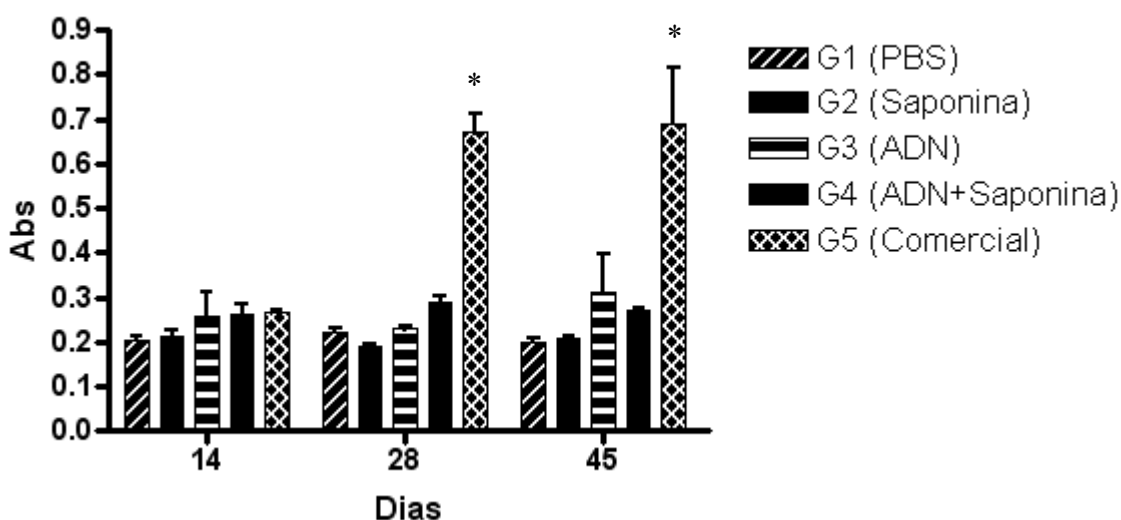


Figura 14: Cinética de produção de anticorpos dos soros coletados nos intervalos entre cada inoculação.

Modelo representado em barras do ELISA indireto mostra os grupos G1, G2, G3, G4 e o grupo G5 nos dias 14, 28 e 45 pós vacinação. Na coleta de soro do dia 14 observou-se uma ligeira produção de anticorpos nos grupos dos animais vacinados com uma única dose. Após a segunda dose no dia 14, observou-se a produção de anticorpos principalmente nos animais inoculados com a vacina comercial, conforme se evidencia na coleta realizada nos dias 28 e 45 com significância estatística ($P < 0,05$) comparado com os controles (*). Na coleta de soro do dia 45 observou-se também um aumento na produção de anticorpos do grupo administrado com adenovírus recombinante, além de a vacina comercial não apresentar significância estatística ($P > 0,05$) quando comparado com o adenovírus recombinante.

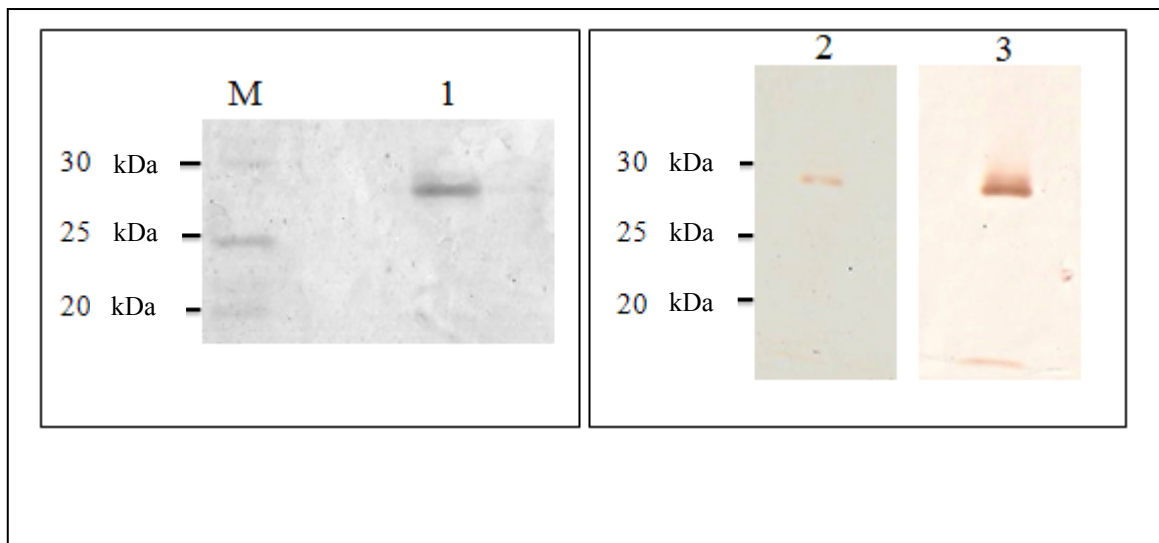


Figura 15: Reação de Western blotting utilizando soro dos camundongos vacinados. Canaleta M: Marcador de massa molecular de 10 a 200 kDa em gel SDS-PAGE. Canaleta 1: Proteína Cap-PCV2 purificada representada em gel SDS-PAGE. Canaleta 2: Western Blotting da proteína Cap-PCV2 marcada com soro de camundongos imunizados com adenovírus recombinante. Canaleta 3: Western Blotting da proteína Cap-PCV2 marcada com soro de camundongos imunizados com vacina comercial. Todos os soros foram utilizados na diluição 1:100.

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas contra o PCV2 tem sido utilizado como estratégia profilática da PMWS, além de auxiliar no controle da carga viral de PCV2 nas granjas de suínos subclínicamente infectados. Vacinas produzidas por tecnologia de DNA recombinante tem sido desenvolvidas baseadas na expressão heteróloga da proteína do capsídeo do PCV2, entre estas pode-se destacar as vacinas de DNA (Silva Jr et al., 2009; Blanchard et al., 2003; Kamstrup et al., 2004), vacina quimérica entre o PCV1-PCV2 (Fenaux et al., 2004), vacinas utilizando o vírus da pseudo-raiva (Song et al., 2007) e o baculovírus (Fan et al., 2008). Apesar da existência de vacinas contra o PCV2 no mercado mundial, não se pode deixar de evidenciar o elevado valor das doses para os produtores. Dessa forma a justificativa da construção de um candidato vacinal que expressa a proteína do capsídeo do PCV2 por adenovírus recombinante é baseada por ser um eficiente mecanismo de adsorção e expressão da proteína do capsídeo nas células, além do candidato vacinal ser construído com a ORF2 de um isolado brasileiro com características moleculares conservadas capazes de prevenir a infecção da maioria das granjas brasileiras.

Neste trabalho, nós construímos um sistema que expressa a proteína do capsídeo do Porcine circovírus 2 por intermédio de um vetor de adenovírus recombinante e, posteriormente, foi avaliado o potencial imunogênico em camundongos BALB/c. A expressão da proteína recombinante do capsídeo do PCV2 foi confirmada por ensaios de *Western blotting*, ensaios de imunoperoxidase em monocamada e ensaios de imunofluorescência.

Posterior aos ensaios de verificação da expressão da proteína, foram realizadas duas inoculações do adenovírus recombinante em modelo murino utilizando um título de 2×10^8 TCID₅₀/50µL (Wang et al., 2006). Nesta segunda etapa experimental foram avaliados alguns parâmetros relativos às respostas imune humoral e celular.

Nos ensaios de linfoproliferação celular não foi evidenciado proliferação de células esplênicas estimuladas com a proteína Cap-PCV2 purificada. Esse fato gera o indício de que a

proteína recombinante purificada atuaria como imunossupressora uma vez evidenciado morte celular, conforme observada na linha pontilhada da figura 11, ao contrário do estímulo com o PCV2 purificado o qual estimulou a proliferação celular com significância estatística ($P < 0,05$) em comparação ao controle (Silva Jr et al., 2009). É possível sugerir a hipótese de que o vírus íntegro estimularia os receptores das APCs e linfócitos, favorecendo uma sinapse imunológica efetiva. Uma segunda hipótese seria que a proteína recombinante na concentração ($5 \mu\text{g/mL}$) poderia ter sido tóxica para as células esplênicas.

Embora a proteína Cap-PCV2 purificada utilizada como estímulo não tenha sido eficiente na técnica de linfoproliferação, ela foi capaz de induzir nos esplenócitos dos animais vacinados a produção de citocinas após 24 horas de incubação a 37°C , com elevada expressão de mRNA de INF- γ (típica de resposta Th1) e não produção de IL-4. A elevada produção de INF- γ observada neste experimento relaciona-se com outro modelo de vacina que utilizaram o sistema de expressão da proteína do capsídeo do PCV2 em baculovírus (Fan et al., 2008). Segundo Ramamoorthy e Meng (2009), o desequilíbrio entre as resposta Th1 e Th2 tem uma importante relação com a genética do hospedeiro. O aumento do mRNA de INF- γ diminui a expressão dos mRNAs de várias citocinas (IL-2, IL-4 e IL-10) e o aumento da IL-10 em suínos infectados com PCV2 suprime a resposta Th1 (Ramamoorthy e Meng, 2009).

Aravindaram et al. (2009) vacinaram camundongos BALB/c com vetores de DNA recombinante que expressam as ORFs 1, 2 e 3 do PCV2 de forma combinada. Neste ensaio também foi observada uma expressão de INF- γ nos camundongos vacinados e uma baixa resposta do tipo Th2 quando os níveis de IL-10 foram mensurados. Segundo Abbas e colaboradores (2008), a elevada expressão de INF- γ é importante para a ativação de macrófagos, estímulo de células efectoras Th1, aumento da expressão de MHC e apresentação de antígeno. Este fato corrobora com a resposta imune celular T CD8⁺ estimulada pelo adenovírus recombinante uma vez que a elevada taxa de transcrição de mRNA de INF- γ está diretamente relacionada com a proliferação dos linfócitos T CD8⁺. Essas características imunológicas foram estimuladas pelo adenovírus recombinante e destaca a importância desse

candidato vacinal na indução de resposta imune celular contra o PCV2.

Baseado na análise dos resultados de citometria de fluxo pode-se observar que o grupo vacinado com adenovírus recombinante (G3) não apresentou variação significativa da população de células T CD4⁺ em relação ao controle, mas mostrou um aumento na população de células T CD8⁺. Entretanto, nos animais do grupo G4 (adenovírus recombinante mais saponina), houve uma baixa população de células T CD4⁺ e não ocorreu uma variação significativa na população de células T CD8⁺, o que sugere que a saponina poderia estar inibindo a resposta imune induzida pelo adenovírus recombinante. Por outro lado, a população de células T CD4⁺ nos animais do grupo comercial (G5), apresentou um aumento estatisticamente não significativo em relação aos animais do grupo controle. Os achados encontrados no FACS indicam que a vacina comercial estimulou a proliferação da população de linfócitos T auxiliar, em contrapartida, o adenovírus recombinante estimulou a proliferação da população de linfócitos T citotóxico. Esses resultados sugerem que células T CD8⁺ estejam associadas com a citotoxicidade específica ao vírus, o que pode contribuir para uma imunidade protetora contra infecções pelo PCV2. A proliferação de linfócito T citotóxico induzida pelo *Plasmodium vivax*, por exemplo, é considerada um mecanismo efetor na proteção imune contra as infecções (Doolan et al., 1996).

Embora o grupo de animais vacinados com adenovírus recombinante (G3) tenha mostrado uma produção efetiva de linfócitos T CD8⁺, o grupo de animais vacinados com adenovírus mais saponina (G4) apresentou uma redução da população de células T CD8⁺. Isso pode ser atribuído a administração do adenovírus juntamente com o adjuvante saponina na dose de inoculação utilizada nos camundongos, o que poderia ter levado a uma desestabilização estrutural do vetor vacinal, comprometendo o processamento eficiente do candidato vacinal na célula.

Nos ensaios de experimentação *in vivo*, todos os grupos vacinados soroconverteram com produção de anticorpos anti-PCV2 a partir de 14 dias após a vacinação. Nos testes de ELISA e *Western blotting* (Figuras 14 e 15) foi possível observar maior produção de

anticorpos após a segunda dose por meio das coletas dos dias 28 e 45 (Figuras 14). Os resultados observados são coerentes com os dados de literatura em que vacinas de vírus inativados (nosso controle comercial) têm maior potencial de produção de anticorpos em relação às vacinas de DNA (caso similar ao nosso candidato vacinal) (Silva Jr. et al., 2009).

Devido ao fato de o vírus propagar-se associado às cromátides irmãs de células filhas (Steiner et al., 2008) e o mesmo se replicar em células endoteliais e epiteliais (Kenneth et al 2009), sugere-se que o adenovírus recombinante seria um bom candidato vacinal uma vez que estimulou a transcrição de mRNA da citocina INF- γ bem como proliferação de linfócitos T citotóxico o que destaca eficiência na eliminação do vírus. Dessa forma, o adenovírus recombinante é um candidato vacinal promissor para ser testado em suíno SPF e convencional.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O PCV2 foi classificado dentro dos subgrupos 1AB, 2D e 2.
- Os isolados brasileiros apresentaram diversidade genética que evidencia o relato de introdução do vírus mais que uma vez.
- Grande parte dos isolados de PCV2 apresentaram origem europeia e asiática.
- O adenovírus recombinante parece possuir um mecanismo eficiente de entrada na célula, pois foi capaz de expressar a proteína do capsídeo do PCV2 *in vitro*.
- Camundongos BALB/c vacinados com o adenovírus recombinante apresentaram uma resposta imune celular específica, pois apresentaram maior proliferação de linfócitos T citotóxico (CD8⁺) em comparação com os animais que receberam a vacina comercial.
- Os animais vacinados com adenovírus recombinante expressaram altos níveis de mRNA de interferon gama (INF- γ).
- Os animais vacinados com o adenovírus recombinante produziram anticorpos principalmente após a inoculação da segunda dose.
- O modelo de vacina utilizado neste trabalho pode ser utilizado em estudos de vacinação em suínos SPF e convencional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. P. 2008. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 268 e 295.
- Albina, E., Truong, C., Hutet, E., Blanchard, P., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., Mahe ,D., Allee, C., Morvan, H., Amenna, N. L.E., Dimna, M., Madec, F and Jestin, A 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology* 125: 292–303.
- Allan, G.M. and Ellis, J.A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 3–14.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly F., Foste, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan B.M and Adair, B.M 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.*, 121: 1-11.
- Almeida, M.R., Silva JR, A., Castro, L.A., Almeida, S.R., Monnerat, F.S., Oliveira, F.S., Moraes, M.P. 2004. Porcine Circoviruses. *Virus Reviews & Research*. 9: 32-42.
- An, D-J., Roh, I-S., Song, D-S., Park, C-K., Park, B-K. 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research*. 129: 115-122.
- Aravindaram, K., T-Y. Kuo, C-W. Lan, H-H. Yu, P-H. Wang, Y-S. Chen, G.H-C. Chen and N-S. Yang, 2009. Protective immunity against porcine circovirus 2 in mice induced by a gene-based combination vaccination. *J. Gene. Med*. 11: 288–301.
- Balasz M., Segalés J., Rosell C., Domingo M., Mankertz A., Urniza A. and Plana-Durán J. 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from

- pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 124: 139-158.
- Barcellos, D.A., Pescador, C.E. 2003. Circovirose suína. *Sanidade em foco.* 6: 3.
- Becker, Y. and Darai, G. 1995. Gene transfer by viral vectors for gene therapy. *J Mol Med.* 73:103-5.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R. 2003 Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine.* 21: 4565–4575.
- Campos, S.K., Barry, M.A. 2007. Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Current Gene Therapy.* 7: 189-204.
- Caravokyri, C., Pringle. C.R. and Leppard. K.N. 1993. Human adenovirus type 5 recombinant expressing simian immunodeficiency virus macace strain gag antigens. *J Gen Virol.* 74: 2819-24.
- Chae, C., 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* 169: 326-336.
- Chang, H.W., Jeng. C.R., Liu. J.J., Lin. T.T.T.L., Chang. C.C., Chia MY; Tsai YC; Pang VF 2005. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet Microb.* 108: 167-177.
- Chengalvala. M.V., Bhat. B.M., Bhat. R., Lubeck. M.D., Mizutani. S., Davis. A.R. and Hung. P.P. 1994. Immunogenicity of high expression adenovirus-hepatitis B virus recombinant vaccines in dogs. *J Gen Virol.* 75: 125-31.
- Cheshenko, N., Krougliak, N., Eisensmith, R.C. and Krougliak, V.A. 2001. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Therapy.* 8: 846–854.

- Cheung, A.K. 2004. Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle meltingpot replication model. *Journal of Virology*. 78: 9016–9029.
- Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R. and Dunham, A.G. 2007 Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol*. 152: 1035-1044.
- Chiarelli Neto, O., Silva Júnior, A., Castro, L.A., Viana, V.W., Silva, F.M.F., Bonfá, G., Moraes, M.P., Almeida, M.R. 2006. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) in animal from slaughter houses in Espírito Santo North region. *Scientia*. 7: 33-44.
- Chiarelli Neto, O., Yotoko, K. C. S., Vidigal, P.M.P., Silva, F. M. F., Castro, L. A., Fietto, J. L. R., Silva-Junior, A., Almeida, M. R. 2009. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Research*. 140: 57-63.
- Chinsagaram. J., Moraes. M.P., Koster. M., Grubman. M.J. 2002. Novel viral disease control strategy: Adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J Virol*. 77: 1621-1625.
- Choi C., Kim J., Kang I.J. and Chae, C. 2002. Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Vet. Rec*. 151: 484-485.
- Ciacchi-Zanella, J.R. and Morés, N. 2001. Diagnostico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovirus Suíno Tipo 2. Comunicado técnico – EMBRAPA – CNPSA. 270: 1-3.
- Clark, E.G. 1997. Post-weaning multissistemic wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. 28: 499-501.

- Csagola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I and Tuboly, T. 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol.* 151: 495–507.
- Cusack, S. 2005. Adenovirus complex structures. *Current Opinion in Structural Biology.* 15: 237–243.
- Darwich, L., Segales, J., Resendes, A., Balasch, M., Plana-Duran, J and Mateu, E. 2008. Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Research in Veterinary Science.* 84: 194–198.
- Darwin, C., 1868. *The Variation of Animals and Plants under Domestication.* John Murray. First edition, first issue. Volume 1.
- Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. & Hoffman, S. L. 1996. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8⁺ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *J Exp Med.* 183: 1739–1746.
- Elahi. S.M., Shen. S.H., Harpin. S., Talbot. B.G. and Elazhary. Y. 1999. Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch Virol.* 144: 1057-1070.
- Fan, H., Pan, Y., Fang, L., Wang, D., Wang, S., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S. 2008. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *Journal of Virological Methods.* 150 : 21–26.
- Fang, M., and Leif, A. 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proc. R. Soc. B.* 273: 1803–1810.
- Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H.S., Li, N., Andersson, L. 2009. Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. *PLoS Genet.* 5: 1000341.

- Fenaux, M., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Royer, R., Thomas, P., Nawagitgul, P., Gill, M., Toth, T.E and Meng, X.J. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *Journal of Virology*. 76: 541–551.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G and Meng, X.J. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *Journal of Virology*. 77: 11232–11243.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F. & Meng, X.J. 2004. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV-2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV-1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.* 78: 6297-6303.
- Ferreira, D., 2001. Proc. PMWS Meeting (ESVV), page 144.
- Finsterbusch, T., Mankertz, A. 2009. Porcine circoviruses—Small but powerful. *Virus Research*. 143: 177–183.
- Gao, G., Zhou, X., Alvira, M.R Tran, P., Marsh, J., Lynd, K., Xiao, W and Wilson, J.M. 2003. High throughput creation of recombinant adenovirus vectors by direct cloning, green-white selection and I-Sce I-mediated rescue of circular adenovirus plasmids in 293 cells; *Gene Therapy*. 10: 1926–1930.
- Gava, D., Zanella, E.L., Morés, N and Ciacci-Zanella J.R. 2008. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues *Pesq. Vet. Bras*. 28: 70-76.

- Giuffra, E., Kijas, J. M. H., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon J.T and Andersson. L. 2000. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics*. 154: 1785-1791.
- Hamel, A.L., Lin, L.L and Nayar, G.P. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72: 5262-5267.
- Harding, J.C. and Clark, E.G. 1997 Recognizing and diagnosing Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5: 201-203.
- Harding. J.C. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract*, 27th Annu. Meet., page 503.
- Harms, P.A. and Sorden, S.D. 2000. Porcine circovirus-associated pneumonia. *Proc.16th IPVS on PMWS: a new emerging disease of swine.* 33-37.
- Hartman, Z.C., Appledorn, D.M. And Amalfitano, A. 2008. Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications, *Virus Research*. 132: 1-14.
- Hasslung. F.C., Berg. M., Allan. G.M., Meehan. M.B., Mcneilly. and Fossum. C. 2003. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN- α production by porcine PBMCs. *J Gen Virol.* 84: 2937-2945.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R.R. 2007. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Research*. 132: 201–207.
- Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J. and Gronenborn, B. 1993. Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *Embo J.* 12: 4445-4452.
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjær-Mikkelsen, A., Botner, A. 2004.

- Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*. 22: 1358-1361.
- Karuppanan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J., 2008. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*. 383: 338-347.
- Kekarainen. T., Montoya. M., Dominguez. J., Mateu. E., Segalés. J. 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. *Vet Immunol Immunopathol*. 124: 41-49.
- Kenneth, C., McCullough., Ruggli, N., Summerfield, A. 2009. Dendritic cells—At the front-line of pathogen attack. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 7–15.
- Kim, J., Ha, Y and Chae, C. 2006. Potentiation of porcine circovirus 2-induced postweaning multisystemic wasting syndrome by porcine parvovirus is associated with excessive production of tumor necrosis factor-alpha. *Veterinary Pathology*. 43: 718–725.
- Kim, J., Han, D.U., Choi, C and Chae, C. 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*. 98: 25–31.
- Kimura, E., Maeda, Y., Arima, T., Nishida, Y., Yamashita, S., Hara, A., Uyama, E., Mita, S and Uchino, M. 2001. Efficient repetitive gene delivery to skeletal muscle using recombinant adenovirus vector containing the Coxsackievirus and adenovirus receptor cDNA. *Gene Therapy*. 8: 20–27.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C and Allan, G. 2005. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17: 213–222.
- Larochelle, R., Bielanski, A., Muller P. & Magar R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boars semen. *J. Clin. Microbiol*. 38: 4629-4632.
- Larochelle, R., Magar, R and D’Allaire, S. 2003. Comparative serologic and virologic study

- of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 67: 114–120.
- Lee, J.H and Welsh, M.J. 1999. Enhancement of calcium phosphate-mediated transfection by inclusion of adenovirus in coprecipitates. *Gene Therapy*. 6: 676–682.
- Lin, C-M., Jeng, C-R., Chang, H-W., Guo, I-C., Huang, Y-L., Tsai, Y-C., Chia, M-Y., Pang, V.F. 2008. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 124: 355–366.
- Liu Q., Wang L., Willson P., O'Connor B., Keenlside J., Chirino-Trejo M., Meléndez R. & Babiuk L. 2002. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can. J. Vet. Res.* 66: 225-231.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H and Kwang .J. 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80: 5065-5073.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J. 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus Type 2-Infected cells and Its role in virus-induced apoptosis. *J Virol.* 79: 8262-8274.
- Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppanan, A.K., Kwang, J. 2007. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J. Virol.* 81: 9560-9567.
- Liu, L.J., Suzuki, T., Tsunemitsu, H., Kataoka, M., Ngata, N., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., Li T.C. 2008. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol.* 153: 2291–2295.
- Lukert. P., De Boer. G.F., Dale. J.L., Keese. P., McNulty MS., Randles JW and Tischer I 1995. *The Circoviridae* 166-168.

- Madec F., Eveno E., Morvan P., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amenna N., Morvan H., Truong C., Mahé D., Albina E. & Jestin A. 2000. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Prod. Sci.* 63: 223-233.
- Magar R., Laroche R., Thibault S. & Lamontagne L. 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J. Comp. Pathol.* 123: 258-269.
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G. & Tood, D. 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Gen. Virol.* 71: 2562-2566.
- Meehan B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M. & Allan, G.M. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79: 2171-2179.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S. & Todd, D., 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plants circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78: 221-227.
- Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H.J. 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol.* 86: 2057-2068.
- Mittal. S.K., Papp. Z., Tikoo. S.K., Baca-Estrada. M.E., Yoo. D., Benko. M. and Babiuk. L.A. 1996. Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncates forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology.* 222: 299-309.
- Monnerat, F.S 2003. Desenvolvimento de técnicas biomoleculares para diagnóstico de circovírus suíno. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 74.

- Moraes, M. P., Mayr, G. A., Grubman, M. J. 2001. pAd5-Blue: direct ligation system for engineering recombinant adenovirus constructs. *BioTechniques*, Westborough. 31: 1050-1055.
- Moraes. M.P., Chinsangaram. J., Brum. M.C.S. and Grubman. M.J. 2003. Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine*. 22: 268-279.
- Mori M., Sato K., Akachi A., Asahi S., Taniguchi S. & Narita M. 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Vet. Pathol.* 37: 667-669.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 36: 2535-2541.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D & Paul, P.S. 2000 Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology.* 81: 2281-2287.
- Nielsen, J., I.E. Vincent, A. Botner, A.S. Ladekaer-Mikkelsen, G.Allan, A. Summerfield and K.C. McCullough. 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92: 97-111.
- Okuda, Y., Ono, M., Yazawa, S and Shibata, I. 2003. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 15: 107–114.

- Olvera, A., Cortey, M., Segalés, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*. 357: 175-185.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J and Halbur, P.G. 2006. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 923–929.
- Opriessnig, T., Meng X.J and Halbur, P.G. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest.* 357: 175-185.
- Philipson, L. 1995. Adenovirus—an eternal archetype. *Curr Top Microbiol Immunol.* 199: 1-24.
- Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J and Sorden S.D. 2000. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunology.* 13: 143–153.
- Prevec, L., Campbell, J.B., Christie, B.S., Belbeck, L. and Graham, F.L. 1990. A recombinant human adenovirus vaccine against rabie. *J Infect Dis.* 161: 27-30.
- Prevec, L., Schneider, M., Rosental, K.L., Belbeck, L.W., Derbyshire, J.B and Graham, F.L. 1989. Use of adenovirus-based vectors for antigen expression in animals. *J Gen Virol.* 70: 429-34.
- Ramamoorthy, S and Meng, X.J. 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 1-20.
- Rodríguez-Arrijoja, G.M., J. Segalés, M. Calsamiglia, A.R. Resendes, M. Balasch, J. Planaduran, J. Casal and M. Domingo. 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 63: 354-357.

- Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodriguez-Arriola G.M. Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S. & Domingo M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120: 59-78.
- Russel, W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 237: 404-413.
- Sambrook, J., Fritch, E.F & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning - A laboratory Manual*. 2nd ed New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci.* 74: 5463–5467.
- Saoulidis K., Kyriakis S.C., Kennedy S., Lekkas S., Miliotis Ch.C., Allan G.M., Balkamos G.C. & Papoutsis P.A. 2002. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *J. Vet. Med. B, Infect Dis. Vet. Publ. Hlth.* 49: 202-205.
- Schulze, C., Neumann, G., Grütze, I., Engelhardt, A., Mirle, C., Ehlert, F., Hlinak, A. 2003. [Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 110: 426-428.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev.* 6: 119-142.
- Segalés, J., Domingo, M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q.* 24: 109-124
- Shibata, I., Okuda, Y., Kitajima, K and Asai, T. 2006. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *Journal of Veterinary Medicine Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health.* 53: 278–280.

- Shibata, I., Okuga, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y. & Hidejima I. 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 405-408.
- Silva-Júnior, A., Castro, L.A., Chiarelli Neto, O., Silva, F.M.F., Vidigal, P.M.P., Moraes, M.P.M and Almeida, M.R. 2009. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. *Pesq. Vet. Bras.* 29: 76-82.
- Sipos, W., Duvigneau, J.C., Willheim, M., Schilcher, F., Hartl, R.T., Hofbauer, G., Exel, B., Pietschmann, P., Schmoll, F. 2004. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 99: 63-71
- Sobestiansky, J., Barbarino, J.R.P., Seyboth, L., Matos, N. 2002. Circovirose suína e circovírus suíno. *Sanidade em foco.* 4: 52.
- Song, Y., Jin, M., Zhang, S., Xu, X., Xiao, S., Cao, S and Chen H. 2007. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology.* 119: 97-104.
- Stanley, J. 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology.* 206: 707-712.
- Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K. 2008. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology.* 378: 311-22.
- Steinfeldt, T., Finsterbusch, T & Mankertz, A. 2001. Rep and Rep' Protein of Porcine circovirus Type 1 Bind to the Origin of Replication in Vitro. *Virology.* 291: 152-160.

- Stevenson, L.S., Gilpin, D.F., Douglas, A., McNeilly, F., McNair, I., Adair, B.M and Allan G.M. 2007. T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*. 20: 389–398.
- Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F., Murakami, H. 2008. Genotypic Change of Porcine Circovirus Type 2 on Japanese Pig Farms as Revealed by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 603-606.
- Tashiro, F., Niwa, H., & Miyazaki. 1999. Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the cre-loxP recombinant system. *Hum Gene Ther.* 10: 1845-1852.
- Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S. & Germann, B. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140: 737-743.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W & Koch, M.A. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.* 295: 64-66.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R. & Pociuli, S. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96: 39-57.
- Tischer, I., Rasch, R. & Tochtermann, G. 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell line. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 226: 153-167.
- Torres. J.M, Sanchez. C., Sune. C., Smerdou. C., Prevec. L., Graham. F. and Enjuanes. L. 1995. Induction of antibodies protection against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein. *Virology.* 213: 503-516.
- Ujvari, S. C. 2008. *A História da Humanidade contada pelos vírus.* São Paulo: Editora

context. 7: 205.

- Vega-Rocha, S., Byeon, I.-J.L., Gronenborn, B., Gronenborn, A.M., Campos-Olivas, R. 2007, Solution Structure, Divalent Metal and DNA Binding of the Endonuclease Domain from the Replication Initiation Protein from Porcine Circovirus 2. *Journal of Molecular Biology*. 367: 473-487.
- Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., Gortázar, C. 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Res.* 35: 243–253.
- Wang, K., Huang, L., Kong, J., Zhang, X. 2008. Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *Journal of Virological Methods*. 150: 1–6.
- Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W., Dong, X. 2007. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*. 121: 215–224.
- Wang, X., Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Feng, Z., Xu, J. 2006. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccine*. 24: 3374–3380.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K. & Ellis, J.A. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 530-532.
- Wu, G.S., Yao, Y.G., Qu, K.X., Ding, Z.L., Li, H., Palanichamy, M.G., Duan, Z.Y., Li, N., Chen, Y.S., Zhang, Y.P. 2007. Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biol.* 8: 245.
- Yoo, D., Graham, F.L., Prevec, L., Parker, M.D., Benko, M., Zamb, T. and Babiuk, L.A. 1992. Synthesis and processing of the haemagglutinin-esterase glycoprotein of bovine

coronavirus encoded in the E3 region of adenovirus. *J Gen Virol.* 73: 2591-2600.

Zanella, J.R.C. & Morés, N. 2003. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55: 522-527.

Zanella, J.R.C., Mores, N., Simon, N., Oliveira, S.R., Gava, D. 2006. Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1988 in Brazil. *Cienc. Rural.* 36: 1480-1485.

Zanella, J.R.C., Simon, N., Pinto, L., Viancelli, A., Fernandes, L., Hayashi, M., Dellagostin, O., Esteves, P. 2009. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Research in Veterinary Science.* 87: 157-160.

ANEXO 1

1. Artigo publicado e material suplementar referente ao capítulo 1



Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches

O. Chiarelli-Neto^a, K.S.C. Yotoko^d, P.M.P. Vidigal^a, F.M.F. Silva^a, L.A. Castro^e, J.L.R. Fietto^{a,b}, A. Silva Jr.^{a,c}, M.R. Almeida^{a,b,*}

^a Molecular Animal Infectology Laboratory, Applied Biotechnology Institute (BIOAGRO), Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

^c Animal Virology Laboratory, Veterinary Medicine Department, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

^d General Biology Department, Federal University of Vicosa, Vicosa, 36570-000, Brazil

^e Molecular Virology Laboratory, Department of Clinical Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 14049-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2008

Received in revised form 3 November 2008

Accepted 3 November 2008

Available online 16 December 2008

Keywords:

PCV2

Bayesian Inference

Haplotypes networks

ABSTRACT

Porcine circovirus 2 (PCV2) is the major causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and is associated with different syndromes affecting pigs. The PCV2 genome has three main open reading frames (ORFs) among which the ORF2 encodes the capsid protein. In this study, the ORF2 nucleotide sequences of 30 Brazilian isolates were analyzed. The sequences were compared to other GenBank sequences using phylogenetic and phylogeographic approaches. Our results show high sequence variability in Brazil, since, in this work, the Brazilian isolates were classified into subgroup 1AB, 2D and 2, which reveals that the virus was introduced in Brazil more than once. On the other hand, most of Brazilian isolates seem to be derived from only one introduction. According to the data from the Pig Breeders' Association, the multiple introductions of the virus probably occurred through the import of animals with the asymptomatic form of the virus or through the import of contaminated semen. The results point to the necessity of implementing programs aimed at selecting sows in order to avoid the import of animals infected by Group 1 PCV2.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Porcine circovirus (PCV) is a small, isometric, nonenveloped virus (17 nm in diameter), pertaining to the *Circovirus* genus and to the *Circoviridae* family. This virus presents single-stranded circular DNA, with approximately 1.76 kb (Lukert et al., 1995). The genome of PCV has three main open reading frames (ORFs) that encode well characterized proteins: ORF1 encodes the viral replicase proteins REP and REP'; ORF2 encodes the viral protein capsid; and ORF3 encodes a protein which leads to cellular apoptosis and which is fundamental to the development of the viral pathogenesis (Liu et al., 2006; Morozov et al., 1998). Two types of PCV were characterized, PCV1 and PCV2. Although PCV1 was initially described as an infectant of porcine kidney (PK15) cell line, it shows no pathogenic traits (Tischer et al., 1974). On the other hand, PCV2 is the major causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome

(PMWS) in pigs, a multifactorial disease. Additional factors, besides the presence of PCV2, are necessary to the development of this clinical disease (Segalés et al., 2005). Other diseases, such as porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), proliferative and necrotizing pneumonia (PNP), perinatal myocarditis and reproductive failures are also associated to PCV2 (Allan and Ellis, 2000). The terminology Porcine Circovirus has been currently used to refer to any of these diseases when they are associated to PCV2 (Almeida et al., 2004).

Economic losses, caused by several pathogenic agents, have stimulated pathogen genetic diversity studies aiming at achieving better understanding in regards to their evolutionary and epidemiological mechanisms (Dulac and Ahmad, 1989; Tischer et al., 1986, 1995). For instance, studies using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were carried out in an attempt of classifying the whole PCV2 genomes in Canada, China and Japan (Hamel et al., 2000; Takahagi et al., 2008; Wen et al., 2005).

Based on phylogenetic studies, a classification model for PCV2 has been proposed by Olvera et al. (2007). Such classification divides the virus lineages into two major groups (1 and 2), which are subcategorized into subgroups from 1A to 1C, and from 2A to 2E. Several studies have demonstrated that isolates from animals

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Vicosa, Av. P.H. Rolfs s/n, Vicosa, 36570-000, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3899 2911; fax: +55 31 3899 2373.

E-mail address: marcia@ufv.br (M.R. Almeida).

with PMWS are more often included in Group 1, whereas isolates from animals without this disease are frequently included in Group 2 (An et al., 2007; Grau-Roma et al., 2008).

ORF2 is a reliable phylogenetic marker for PCV2 strains because it allows the reconstruction of the same tree which could be reconstructed through the whole viral genome analysis (Olvera et al., 2007). In addition, ORF2 is under less selective pressure than ORF1, accumulating more variability and providing more informative sites for phylogenetic tree reconstructions (Olvera et al., 2007). Furthermore, ORF2 would be a more suitable molecular marker for epidemiological and phylogenetic studies since its sequencing is less labor extensive than the sequencing of the whole genome (De Boisseson et al., 2004; Opriessnig et al., 2006; Takahagi et al., 2008).

In Brazil, due to the recent damages caused by PMWS, several researchers have been isolating PCV2 in porcine farms in different regions, such as in the States of Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Minas Gerais (MG), Rio Grande do Sul (RS) and Santa Catarina (SC) (Barcellos and Pescador, 2003; Chiarelli-Neto et al., 2006; Ciaccianella and Mores, 2001; Sobestiansky et al., 2002). Castro et al. (2007) showed that Brazilian ORF2 sequences present from 91.9 to 100% identity with Asian, European, North American and African isolates. They highlighted that a sequence sampled in Minas Gerais presented 100% of identity with ORF2 sequences sampled in France and in the United Kingdom, which allows them to conclude that the virus was introduced in Brazil through the import of European pigs.

In this work, we have amplified the sample of Brazilian sequences through cloning and sequencing ORF2 from 11 new isolates of PCV2 sampled in six different Brazilian states. These sequences were compared to others available in GenBank, which were already properly identified by the classification model proposed by Olvera et al. (2007). Our objectives were (1) to classify the Brazilian isolates using this system, (2) to evaluate the genetic diversity of the virus in Brazil and (3) to test whether the virus was imported from European pigs, as stated by Castro et al. (2007).

2. Materials and methods

2.1. Isolation of PCV2

A total of eleven samples of Brazilian animals with classic clinical signs of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) were collected, in 2005, in six Brazilian states. One sample (EU755378) was from Bahia (BA), four samples (EU755371, EU755372, EU755374, EU755379) were from Espírito Santo (ES), one sample (EU755376) was from Minas Gerais (MG), one sample (EU755373) from Parana (PR), two samples (EU755377, EU755381) from Santa Catarina (SC) and two samples (EU755375, EU755380) were from São Paulo (SP). Fig. 1 shows the sampling sites for all of the Brazilian sequences used in this work. Two samples (DQ856575 and DQ861901) did not present any identification regarding the state or region of origin.

After the collection, each sample was frozen at -20°C and used for virus isolation and subsequent cultivation in porcine kidney cells (SK6) free of PCV2. The cells were propagated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in the presence of 1 g/l streptomycin and 750 mg/l penicillin. After 24 h, the cells were treated with 300 mM D-glucosamine (SIGMA, Germany) and then incubated for 48 h at 37°C . The total DNA was then extracted with the Genomic DNA Purification Kit from Tissue (PROMEGA, USA).

2.2. Amplification, cloning and sequencing of ORF2

The viral DNA (720 bp) was amplified through the polymerase chain reaction (PCR) technique using specific oligonucleotides:

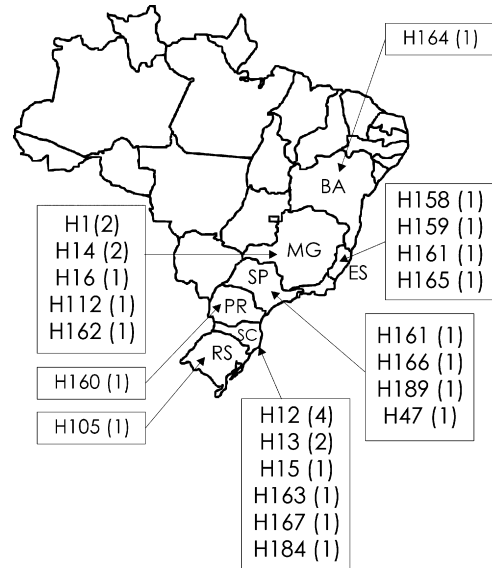


Fig. 1. Map showing the collection sites of PCV2 isolates. The numbers in parenthesis () correspond to the frequencies of each haplotype in Brazilian states: BA, Bahia; ES, Espírito Santo; MG, Minas Gerais; PR, Parana; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul.

FCAP 5'-GGCTAGCCGATGACGTATCCAAG-3' (Forward) and RCAP 5'-GACGCGTCGTTAGGGTTAAAGT-3' (Reverse), constructed from the Brazilian PCV2 isolate sequence (DQ364650). Amplification was carried out in 30 cycles with the annealing temperature at 55°C . The PCR product was cloned in the pGEM vector using the pGEM-T – Easy™ kit (PROMEGA, USA). Plasmid DNA was purified with Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (PROMEGA, USA). DNA sequencing adapted by Sanger et al. (1977) was used to confirm the sequences in a MegaBACE 1000 (GE Healthcare), by using the M13 Forward and Reverse primers.

2.3. Nucleotide sequence analysis

The ORF2 nucleotide sequences of the PCV2 genome were edited using the Chromaspro1.34 program (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) in order to remove the vector regions. A search for other ORF2 sequences was performed in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Three hundred and twenty sequences were selected and then aligned with those eleven sequences obtained in this study using the ClustalW program with default parameters (Thompson et al., 1994). The alignment of all sequences was visually inspected using Mega 4.0 (Tamura et al., 2007). All used sequences are specified in Supplemental Table 1.

A phylogenetic hypothesis was inferred through Bayesian Inference (BI) in the Mr.BAYES 3.1 program (Huelsenbeck and Ronquist, 2005; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). In order to speed up the construction of the trees, a basic model of nucleotide substitution was inferred with the aid of the MrModeltest program (Nylander et al., 2004). This approach supplies MRBAYES 3.1 with the parameters which must be estimated, in order to avoid the excess of parameters used in both topology and branch size estimations. An initial analysis was performed by using all GenBank sequences available plus the new sequences found in this study (total of 331 sequences). For the sake of simplicity, a second analysis was carried out, including only the samples of Brazilian isolate sequences and a limited number of GenBank sequences, representing all groups of a previous PCV2 classification model (Olvera et al., 2007). Indeed, this second analysis contains only 93 unique

sequences, or haplotypes (all sequences which showed 100% identity with any other sequence included were not considered). In addition, since most GenBank sequences fall into subgroup 1AB, and most of them either correspond to a single haplotype (named H1) or differ from H1 by only one nucleotide, we also decided to exclude all these haplotypes from our simplified phylogenetic tree.

Once the phylogenetic tree was constructed, we localized the Brazilian Haplotypes within the respective groups and subgroups and constructed haplotype networks (Bandelt et al., 1999) using those groups which contain Brazilian sequences, in order to visualize the relationships of these sequences with the sequences recovered by GenBank, which were sampled around the world. These analyses were performed using the Median Joining (MJ) algorithm implemented into the Network 4.2.0.1 program (<http://www.fluxus-engineering.com>).

3. Results

Fig. 2 shows the simplified phylogenetic hypothesis (see Sections 2 and 2.3) found in this study and built by using the 93 haplotypes sequenced for PCV2-ORF2 sequences. This tree shows almost all of the groups and subgroups proposed by Olvera et al. (2007). The only difference refers to fact that, in the tree presented in this paper, subgroups 1A and 1B were merged into a single subgroup 1AB. Most sequences found in GenBank, as well

as the majority of Brazilian sequences (28 out of 30), were included into subgroup 1AB. On the other hand, one Brazilian sequence (DQ856568) was included within the H184 haplotype, classified as 2D. The phylogenetic tree also shows the existence of one Brazilian isolate sequence (DQ856572–H189) near the subgroups 2A and 2D but not classified within any subgroup pertaining to Group 2 (Fig. 2).

Fig. 3 shows the sequence network of subgroup 1AB, containing all sequences classified within this subgroup by the complete phylogenetic tree constructed preliminarily (data not shown, Sections 2 and 2.3). Differently from the phylogenetic tree, the network allows the representation of the frequency in which each haplotype appeared, as well as the labeling of sequences regarding their geographic origin. In this work, we labeled differently Brazilian, North American, European or Asian sequences. In this sense, it is noticeable that the haplotype H1 is very frequent in several locations: Europe, Asia and also in Brazil. This haplotype occupies a central position in the net. Several other haplotypes, coming from samples collected in different continents, show only one different nucleotide in comparison to the H1 haplotype, thus suggesting its ancestry. It is also possible to observe a tight aggregation of North American sequences (showed in black with haplotypes not marked with +), which seem not to be related to Brazilian sequences (showed in black with haplotypes marked with +). In addition, Fig. 3 also shows that only H47 haplotype is divergent in relation to other Brazilian haplotypes.

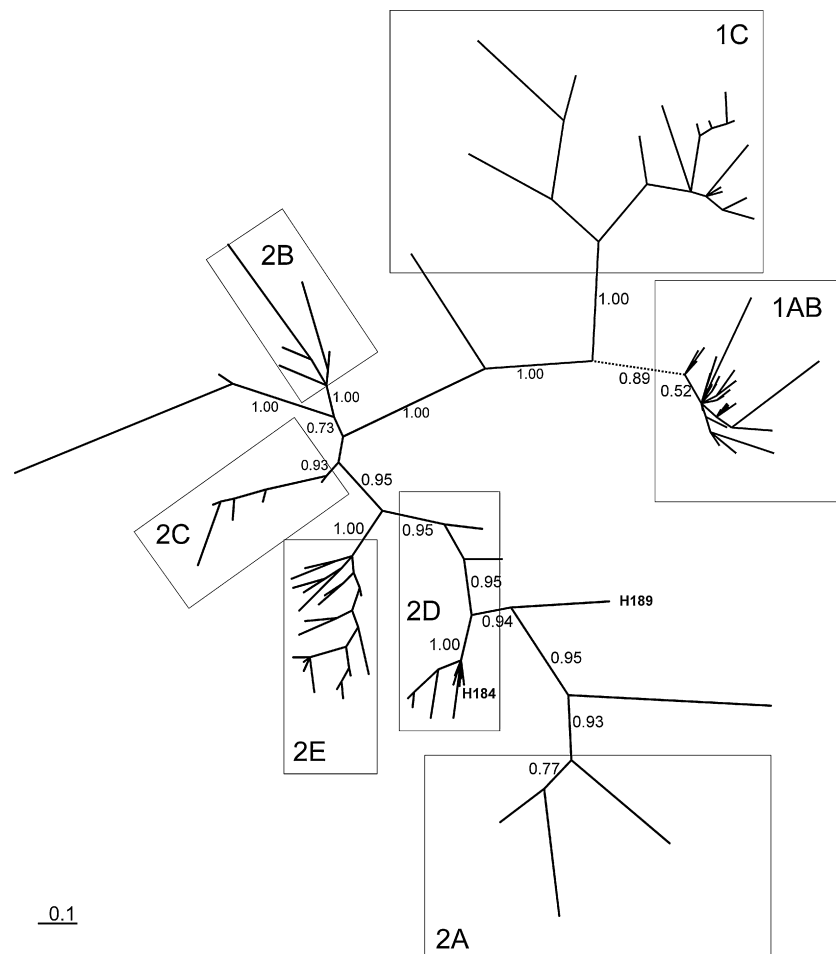


Fig. 2. Majority rule consensus tree obtained through Bayesian analysis of the 93 haplotypes of PCV2-ORF2. The posterior probability values calculated using the best trees found by MrBayes are shown beside each interior branch. Squares delimitate the subgroup classification model for PCV2 proposed by Olvera et al. (2007). Most Brazilian species fall into subgroup 1AB with exceptions of H184 and H189, which fall within Group 2.

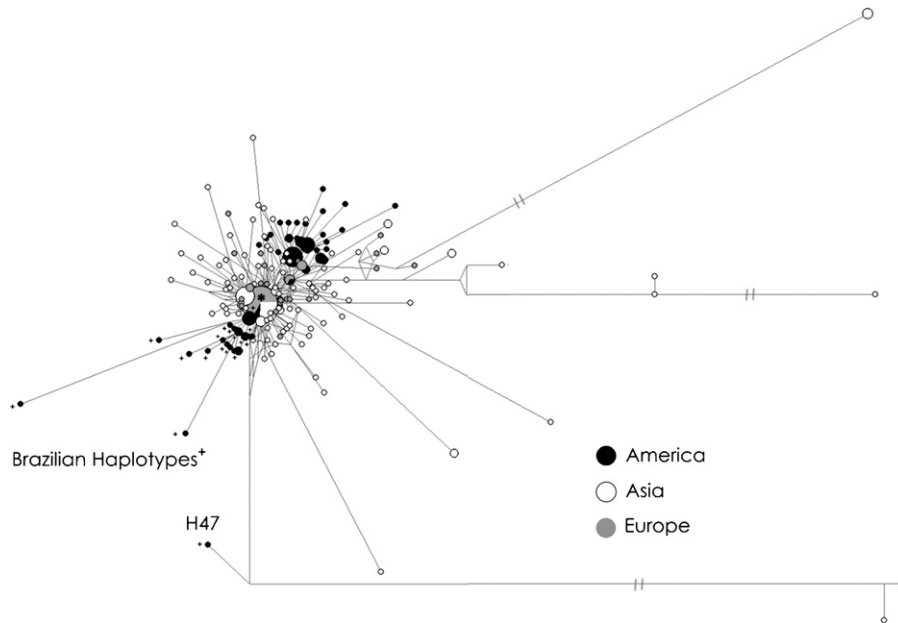


Fig. 3. Median-joining network of the haplotypes classified in subgroup 1AB built on the Network v 4.2.0.1 program application. Circumference sizes are relatively proportional to the haplotypes relative frequencies. A black asterisk marks the H1 haplotype; whereas a plus (+) signal marks the haplotypes exclusively sampled in Brazil.

Also based on the complete phylogenetic tree, a network was constructed using Group 2 GenBank sequences (60 sequences), as well as the Brazilian sequences classified as H184 and H189 (Fig. 4). H184 is the most frequent haplotype within subgroup 2D, and it was sampled once in Brazil, two times in Europe (Germany and Hungary) and once in China (see Supplemental Table 1). On the other hand, H189, sampled only in Sao Paulo state, did not cluster

with any Brazilian Haplotype neither was classified into any subgroup, as already mentioned (see Fig. 2). Nevertheless, it seems to be genetically connected to the European haplotype H171, coming from Germany, as evidenced in Fig. 4.

Finally, Fig. 5 shows the relationships of the Brazilian isolates with the H1 haplotype. Twenty-eight of thirty Brazilian isolates were clustered into subgroup 1AB. Two of them were classified

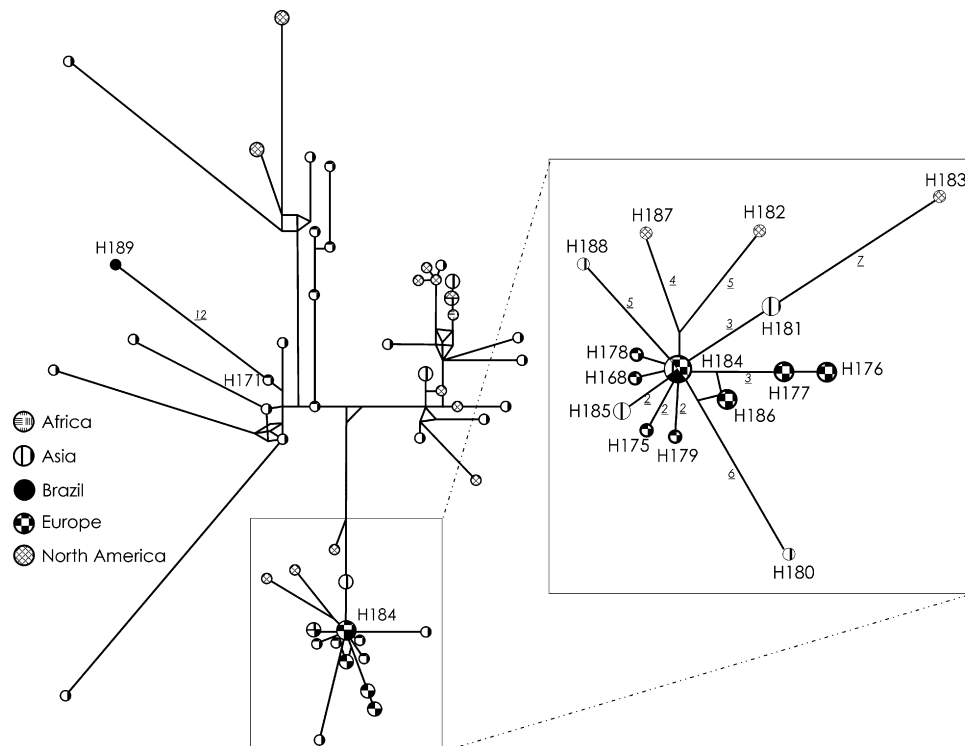


Fig. 4. (A) Median-joining network of Group 2 haplotypes built on the Network v 4.2.0.1 program application. Circumference sizes are proportional to the haplotypes relative frequencies. H184 and H189 codes correspond to the Brazilian haplotypes classified into Group 2—see Table 1. (B) Median-joining network zoom of subgroup 2D, which contains the haplotype H184, sampled in Brazil, Europe and China.

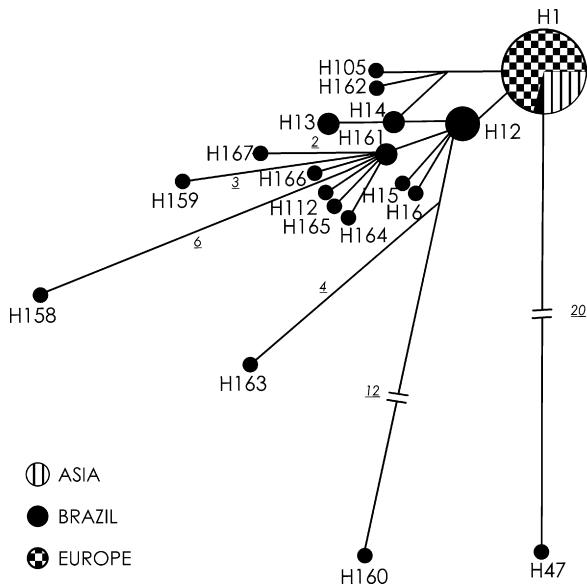


Fig. 5. Median-joining network zoom of Brazilian haplotypes found in subgroup 1AB. Circumference sizes are relatively proportional to the haplotypes relative frequencies. The number of substitutions between each pair of haplotypes is represented beside the line which connects them.

as H1, and the other 26 clearly are descendants of H1, being found exclusively in Brazil. Furthermore, most of Brazilian isolate sequences were derived from H12 (six of them were classified as H12), except for H47 – which is clearly not related to H12 – H105, H162 and probably H13 and H14 (Fig. 5).

4. Discussion

The first objective of this work was to classify the Brazilian isolates of PCV 2 using the system proposed by Olvera et al. (2007). In order to perform that, we constructed a phylogenetic tree including 30 Brazilian PCV2 isolate sequences, among which 11 were derived from this study, and 301 correspond to non-Brazilian sequences (see Supplemental Table 1). Fig. 2 shows the simplified phylogenetic tree (see Sections 2 and 2.3), which contains all groups and subgroups proposed by Olvera et al. (2007), except for the lack of division of subgroups 1A and 1B. This result was expected, since the subgroup 1B consists of recombinant isolates which inherit ORF2 from 1A and ORF1 from 2D subgroup (Olvera et al., 2007). Thus, the ORF2 of 1A and 1B have the same origin and, consequently, cluster in the same subgroup.

Among the 30 Brazilian sequences included in this study, 28 were classified into subgroup 1AB, and, as well as most sequences of subgroup 1AB, present high nucleotide identity with haplotype H1, the most frequent haplotype found in this study (Fig. 3). Among these 28 sequences, only the isolate whose sequence was designed as haplotype H47 (DQ856573) presented a high number of nucleotides substitutions when compared to H1 (see Figs. 3 and 5), sharing no nucleotide substitutions with other Brazilian sequences. Indeed, H47 shares some nucleotide substitutions with H92, exclusively sampled in China (*data not shown*). The remaining 27 haplotypes present a higher nucleotide identity with H1, and share most of the nucleotide substitutions (Fig. 5). Fig. 5 also suggests that these 27 sequences are closely related, two of them were classified as H1 and the remaining 25 clearly are descended from H1. The remaining two sequences, named as H184 and H189, clustered into Group 2. H184 belongs to subgroup 2D and was sampled in Brazil, Europe (Germany and Hungary) and China (see Supplemental Table 1). H189 did not cluster within any subgroup,

and is distantly related to the European haplotype H171 originated from Germany, as evidenced in Fig. 4.

Regarding the genetic diversity of PCV2 in Brazil, our second question, a little sample of 30 isolates revealed very distantly related sequences, which means that the virus was introduced in Brazil more than once, since there are isolates clustering into subgroups 1AB, 2D, and there is even an isolate which could not be classified through the Olvera's et al. (2007) system. The presence of unclassified sequences might mean that the genetic diversity of the virus is so large that the classification system, tested into hundreds of sequences, cannot cover all of the diversities. It is important to emphasize, however, that the genetic diversity of the Brazilian isolates is concentrated into subgroup 1AB, with only two exceptions.

In regards to our third question, which was to test whether the virus was imported from European matrices, our sample can respond at least to a part of the question. Given the high frequency of H1 and its prevalence throughout the world, it is difficult to state that all of the Brazilian isolates clustered into subgroup 1AB derived from a unique introduction. However, due to the fact that most of them seem to derive from H12 (and H12 was exclusively sampled in Brazil—see Table 1), it is possible to infer that at least 21 isolates (or perhaps 25, if we include the isolates classified as haplotypes H13 and H14, see Fig. 5) share a common ancestor, and are thus derived from a single event of introduction in Brazil. It is important to emphasize that these 25 sequences were sampled exclusively in Brazil (Table 1) and that the nucleotide substitutions found in these haplotypes are not shared by haplotypes sampled in other countries, demonstrating that such substitutions occurred after the introduction in Brazil.

The haplotype H1 also seems to be the common ancestor of most isolates from Asia and America, and is broadly distributed in Europe (Supplemental Table 1 and Fig. 3). Similarly, H184 was found in Brazil, Europe and China, while H189 is distantly related to the European haplotype (H171). Considering only these data, it is very difficult to state if the Brazilian virus lineages descend predominantly from Europe or from Asia since almost all Brazilian haplotypes – except H189 – are identical to or are descendant of haplotypes which very common both in Europe and in Asia. Nonetheless, the import of animals and semen from Europe by the program of swine improvement in Brazil suggests that the introductions of the viruses are due to European sows or semen. Unfortunately, it is not possible to determine the exact year of introduction of any of these haplotypes in Brazil. However, data from the Brazilian Pig Breeders' Association (*unpublished data*) show high rates of import of animals and semen from Europe a few years before the date of the first description of PMWS in Brazil in 2000 (Ciacci-zanella and Mores, 2003). Given that the sampling process was performed in different Brazilian regions, as well as from independent pork breeders, it is reasonable to infer that regardless the fact that our sample is small, it can be significant, and might suggest that most of the Brazilian animals infected have contracted the virus from Brazilian lineages, which probably are descendant of few events of virus introduction in Brazil through European pigs.

If our Brazilian sample is indeed significant, our results mean that only few PCV2 introductions were enough to disseminate the PMWS in Brazil. If we join this with the fact that virus lineages could recombine and eventually form new lineages, potentially more infective, it is imperative to avoid the import of new lineages from other countries. Since PCV2 needs to be associated to other infectious and non-infectious factors (Segalés et al., 2005), it is possible that other isolates have been entered in Brazil in their asymptomatic form or through imported semen. Thus, the only way to hold the expansion of more pathogenic isolates and avoid the damages resulting from this expansion is the proper management of these animals, mainly obstructing the co-infection of potentially

Table 1
Distribution of the haplotypes by country of sampling. The haplotypes marked with an asterisk (*) were exclusively sampled in a unique country. The code in parenthesis () corresponds to the haplotype classification, and the total sequence of each country shown in the third column.

Country	Haplotypes (classification)	Total (sequences)
Austria	H1(1A); H153*(1A); H176*(2D); 177*(2D)	6
Brazil	H1(1AB); H12–16*(1AB); H47*(1AB); H105*(1AB); H112*(1AB); H158–167*(1AB); H184(2D); H189*(2).	30
Canada	H17(1); H18(1); H20(1); H45(1); H106(1A); H107*(1); 108*(1); H173*(2A); 174*(2A); H182*(2D); H227*(2E); H229*(2E); 230*(2E).	22
China	H1(1-1A-1B); H3–11*(1); H36–40*(1); H46*(1); H48–81*(1); H82*(1-1A-1B); H83–91*(1); H92*(1A); H93–98*(1); H102–104*(1); H109–111*(1); H113–120*(1); H121–123*(1A); H124(1A); H125(1A); H126*(1A); H130*(1A); H131*(1B); H132*(1A); H133*(1B); H134*(1A); H135*(1A); H136*(1B); H137(1A); 138*(1A); H155*(1A); 156*(1A); H169*(2); H180*(2D); 181*(2D); H184(2D); H188*(2D); H190*(1A); H191*(1C); H193*(1C); H195–204*(1C); H215*(2E); H216*(2E); H220*(2E); H225(2E); H228*(2E).	150
Denmark	H1(1); H2*(1).	9
France	H1(1A); H139–152*(1A); H157*(1A); H175*(2D).	24
Germany	H171*(2); H184–185(2D); H192*(1C).	4
Hungary	H1(1); H124(1A); H154*(1A); H168*(2D); H178*(2D); H179*(2D); H184*(2D); H210(2C); H211*(2C).	11
Japan	H172*(2A); H225(2E); H226*(2E).	3
Korea	H222*(2E).	1
Netherlands	H1(1A-1B); H106(1A); H127*(1A); H128*(1A); H129*(1A); H194*(1C).	9
Romanian	H1(1).	1
South Africa	H218*(2E).	1
South Korea	H185(2D); H223*(2E); H224*(2E).	3
Spain	H212–214*(2C).	3
Sweden	H99–101*(1); H186*(2D).	5
Taiwan	H170*(2); H205–209*(2B); H221*(2E).	7
United Kingdom	H1(1A).	1
USA	H17–18(1); H19*(1); H20(1); H21*(1); H22*(1); H23*(1A); H24*(1A); H25*(1); H26–35*(1A); H41–44*(1); H45(1); H183*(2D); H187*(2D); H216(2E); H217*(2E) H219*(2E); H231*(2E).	41

more pathogenic PCV2 with other infectious agents. It is also necessary to develop a selective program for importing sows, in which the samples are subjected to diagnostic tests aiming to identify contaminated sows and semen bearing PCV2 of Group 1, avoiding the introduction of more variant pathogens of the virus in Brazil.

Acknowledgment

The authors would like to thank FAPEMIG for the financial support for this research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virusres.2008.11.002.

References

- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
- Almeida, M.R., Silva Jr., A., Castro, L.A., Almeida, S.R., Monnerat, F.S., Oliveira, F.S., Moraes, M.P., 2004. Porcine circoviruses. *Virus Rev. Res.* 09, 32–42.
- An, D.J., Roh, I.S., Song, D.S., Park, C.K., Park, B.K., 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res.* 129, 115–122.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Barcellos, D.A., Pescador, C.E., 2003. Circovirose Suína. *Sanidade em foco* 6, 3.
- Castro, A.M.M.G., Cortez, A., Heinemann, M.B., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., 2007. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Arch. Virol.* 152, 1435–1445.
- Chiarelli-Neto, O., Silva Jr., A., Castro, L.A., Viana, V.W., Silva, F.M.F., Bonfá, G., Moraes, M.P., Almeida, M.R., 2006. Detecção do Circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em animais de abate no centro norte do estado do Espírito Santo. *Scientia* 7, 33–44.
- Ciacchi-zanella, J.R., Mores, N., 2001. Diagnóstico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovirus Suíno Tipo 2. *Comunicado técnico – EMBRAPA – CNPSA* 270, 1–3.
- Ciacchi-zanella, J.R., Mores, N., 2003. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55, 522–527.
- De Boisseson, C., Beven, V., Bigarre, L., Thiéry, R., Rose, N., Eveno, E., Madec, F., Jestin, A., 2004. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from

- post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J. Gen. Virol.* 85, 293–304.
- Dulac, G.C., Ahmad, A., 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53, 431–433.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., L'opez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128, 23–35.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E., Nayar, G.P., 2000. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64, 44–52.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2005. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: Nielsen, R. (Ed.), *Statistical Methods in Molecular Evolution*. Springer, New York.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 80, 5065–5073.
- Lukert, P.D., De Boer, G.F., Dale, J.L., Keese, P., McNulty, M.S., Randles, J.W., Fischer, I., 1995. The Circoviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), *Virus Taxonomy: Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Verlag, Vienna and New York, pp. 166–168.
- Morozov, I., Sirinarumit, T., Sorden, S.D., Halbur, G., Morgan, M.K., Yoon, K., Paul, P.S., 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2535–2541.
- Nylander, J.A.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves Aldrey, J.L., 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Syst. Biol.* 53, 47–67.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185.
- Opriessnig, T., Mckeown, N.E., Zhou, E.M., Meng, K.J., Halbur, P.G., 2006. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J. Gen. Virol.* 87, 2923–2932.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES: 3 Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
- Sobestiansky, J., Barbarino, J.R.P., Seyboth, L., Matos, N., 2002. Circovirose Suína e circovirus suíno. *Sanidade em foco* 4, 52.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Takahagi, Y., Nishiyama, Y., Toki, S., Yonekita, T., Morimatsu, F., Murakami, H., 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 603–606.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., Germann, B., 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140, 737–743.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Greim, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91, 271–276.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell line. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A)* 226, 153–167.
- Wen, L., Guo, X., Yang, H., 2005. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet. Microbiol.* 110, 141–146.

1 **Supplemental Table 1.** Classification of the sequences with their respective haplotype frequencies used
2 in the haplotype networks and in the phylogenetic tree. The sequences marked with the asterisk (*)
3 correspond to the ones used in the construction of the phylogenetic tree presented in this study. The
4 sequences marked with the signal (#) correspond to the isolates sequenced by the authors of this paper.

5 **Supplemental Table 1**

HAPLOTYPE	FREQ.	ACCESS NUMBERS	GROUP	INFORMATION
H1	31	<u>EU136720</u>	1	DENMARK
		<u>EU136719</u>	1	DENMARK
		<u>EU136718</u>	1	DENMARK
		<u>EU136717</u>	1	DENMARK
		<u>EU136715</u>	1	DENMARK
		<u>EU136714</u>	1	DENMARK
		<u>EU136713</u>	1	DENMARK
		<u>EU136712</u>	1	DENMARK
		<u>DQ856565</u>	1AB	BRAZIL (MG)
		<u>DQ856563</u>	1AB	BRAZIL (MG)
		<u>EF524528</u>	1	CHINA
		<u>AY579893*</u>	1A	CHINA
		<u>EF524516</u>	1	CHINA
		<u>EF493837</u>	1	CHINA
		<u>EF190934</u>	1	CHINA
		<u>DQ648031</u>	1	HUNGARY
		<u>AY874168</u>	1	HUNGARY
		<u>AY874163</u>	1	HUNGARY
		<u>DQ233257</u>	1	ROMANIAN
		<u>AY849938</u>	1A	CHINA
		<u>AY484416</u>	1A	NETHERLANDS
		<u>AY484414</u>	1A	UNITED KINGDOM
		<u>AY484407</u>	1B	NETHERLANDS
		<u>AY682990</u>	1A	CHINA
		<u>AY691169</u>	1B	CHINA
		<u>AY322002</u>	1A	FRANCE
		<u>AY322000</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321997</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321995</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321990</u>	1A	FRANCE
		<u>AY424405</u>	1A	AUSTRIA
H2	1	<u>EU136716</u>	1	DENMARK
H3	1	<u>EF675244</u>	1	CHINA
H4	2	<u>EF675243</u>	1	CHINA
		<u>EF675238</u>	1	CHINA
H5	2	<u>EF675242</u>	1	CHINA
		<u>EF675236</u>	1	CHINA
H6	1	<u>EF675240</u>	1	CHINA
H7	2	<u>EF675239</u>	1	CHINA
		<u>EF675237</u>	1	CHINA
H8	2	<u>EF675235</u>	1	CHINA
		<u>EF675234</u>	1	CHINA
H9	1	<u>EF675233</u>	1	CHINA

H10	1	<u>EF675232</u>	1	CHINA		
H11	1	<u>EF675231</u>	1	CHINA		
H12	6	<u>DQ856581*</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
		<u>DQ856579</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
		<u>DQ856575</u>	1AB	BRAZIL		
		<u>DQ861901</u>	1AB	BRAZIL		
		<u>DQ861900</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
		<u>DQ861898</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
H13	2	<u>DQ856578*</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
		<u>DQ861897</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
H14	2	<u>DQ856577*</u>	1AB	BRAZIL (MG)		
		<u>DQ861902</u>	1AB	BRAZIL (MG)		
H15	1	<u>DQ856567*</u>	1AB	BRAZIL (SC)		
H16	1	<u>DQ856564*</u>	1AB	BRAZIL (MG)		
H17	7	<u>EF394779</u>	1	CANADA		
		<u>EF394778</u>	1	CANADA		
		<u>DQ629126</u>	1	USA		
		<u>DQ220735</u>	1	CANADA		
		<u>DQ220732</u>	1	CANADA		
		<u>DQ220728</u>	1	CANADA		
		<u>DQ220727</u>	1	CANADA		
		H18	11	<u>EF394777</u>	1	CANADA
				<u>EF619970</u>	1	USA
				<u>DQ629116</u>	1	USA
				<u>DQ629115</u>	1	USA
<u>EF452361</u>	1			USA		
<u>EF452360</u>	1			USA		
<u>EF452359</u>	1			USA		
<u>DQ220739</u>	1			CANADA		
H19	3	<u>DQ220734</u>	1	CANADA		
		<u>DQ220730</u>	1	CANADA		
		<u>DQ220729</u>	1	CANADA		
		<u>EF619971</u>	1	USA		
		<u>EF452358</u>	1	USA		
		<u>EF452350</u>	1	USA		
		H20	3	<u>DQ629119</u>	1	USA
<u>DQ629125</u>	1			USA		
<u>DQ220731</u>	1			CANADA		
H21	2	<u>DQ629118</u>	1	USA		
		<u>DQ629124</u>	1	USA		
H22	1	<u>DQ629117</u>	1	USA		
H23	1	<u>DQ629135</u>	1A	USA		
H24	1	<u>DQ629134</u>	1A	USA		
H25	1	<u>DQ629133</u>	1	USA		
H26	1	<u>DQ629132</u>	1A	USA		
H27	1	<u>DQ629131</u>	1A	USA		
H28	1	<u>DQ629130</u>	1A	USA		
H29	1	<u>DQ629129</u>	1A	USA		
H30	1	<u>DQ629128</u>	1A	USA		
H31	1	<u>DQ629127</u>	1A	USA		
H32	1	<u>DQ629123</u>	1A	USA		
H33	1	<u>DQ629122</u>	1A	USA		

H34	1	<u>DQ629121</u>	1A	USA
H35	1	<u>DQ629120</u>	1A	USA
H36	1	<u>EF592576</u>	1	CHINA
H37	1	<u>EF592575</u>	1	CHINA
H38	1	<u>EF560610</u>	1	CHINA
H39	1	<u>EF560609</u>	1	CHINA
H40	1	<u>EF560608</u>	1	CHINA
H41	2	<u>EF452363</u>	1	USA
		<u>EF452357</u>	1	USA
H42	1	<u>EF452362</u>	1	USA
H43	1	<u>EF452356</u>	1	USA
H44	2	<u>EF452355</u>	1	USA
		<u>EF452354</u>	1	USA
H45	2	<u>EF452351</u>	1	USA
		<u>DQ220738</u>	1	CANADA
H46	1	<u>EF524542</u>	1	CHINA
H47	1	<u>DQ856573*</u>	1AB	BRAZIL (SP)
H48	1	<u>EF524539</u>	1	CHINA
H49	1	<u>EF524538</u>	1	CHINA
H50	3	<u>EF524537</u>	1	CHINA
		<u>EF524532</u>	1	CHINA
		<u>EF524526</u>	1	CHINA
H51	1	<u>EF524536</u>	1	CHINA
H52	1	<u>EF524535</u>	1	CHINA
H53	1	<u>EF524534</u>	1	CHINA
H54	1	<u>EF524530</u>	1	CHINA
H55	1	<u>EF524529</u>	1	CHINA
H56	1	<u>EF524527</u>	1	CHINA
H57	1	<u>EF524525</u>	1	CHINA
H58	1	<u>EF524524</u>	1	CHINA
H59	1	<u>EF524522</u>	1	CHINA
H60	1	<u>EF524521</u>	1	CHINA
H61	1	<u>EF524520</u>	1	CHINA
H62	1	<u>EF524519</u>	1	CHINA
H63	1	<u>EF524515</u>	1	CHINA
H64	1	<u>DQ997817</u>	1	CHINA
H65	1	<u>DQ997816</u>	1	CHINA
H66	1	<u>DQ997815</u>	1	CHINA
H67	1	<u>EF515839</u>	1	CHINA
H68	1	<u>EF493842</u>	1	CHINA
H69	1	<u>EF493841</u>	1	CHINA
H70	1	<u>EF493840</u>	1	CHINA
H71	1	<u>EF493839</u>	1	CHINA
H72	1	<u>EF493838</u>	1	CHINA
H73	1	<u>EF467928</u>	1	CHINA
H74	1	<u>EF421973</u>	1	CHINA
H75	1	<u>EF421972</u>	1	CHINA
H76	1	<u>EF421971</u>	1	CHINA

H77	1	<u>EF421970</u>	1	CHINA
H78	1	<u>EF421969</u>	1	CHINA
H79	1	<u>EF421968</u>	1	CHINA
H80	1	<u>EF421967</u>	1	CHINA
H81	1	<u>EF210106</u>	1	CHINA
H82	10	<u>EF197987</u>	1	CHINA
		<u>EF190943</u>	1	CHINA
		<u>EF190942</u>	1	CHINA
		<u>EF190939</u>	1	CHINA
		<u>EF190937</u>	1	CHINA
		<u>EF190933</u>	1	CHINA
		<u>EF190923</u>	1	CHINA
		<u>DQ180393</u>	1	CHINA
		<u>AY604430</u>	1A	CHINA
		<u>AY556475*</u>	1B	CHINA
H83	1	<u>EF197986</u>	1	CHINA
H84	1	<u>EF190941</u>	1	CHINA
H85	1	<u>EF190940</u>	1	CHINA
H86	1	<u>EF190938</u>	1	CHINA
H87	1	<u>EF190936</u>	1	CHINA
H88	1	<u>EF190935</u>	1	CHINA
H89	1	<u>EF190932</u>	1	CHINA
H90	1	<u>EF190931</u>	1	CHINA
H91	1	<u>EF190930</u>	1	CHINA
H92	3	<u>EF190929</u>	1A	CHINA
		<u>AF381176</u>	1A	CHINA
		<u>AY217743</u>	1A	CHINA
H93	1	<u>EF190928</u>	1	CHINA
H94	1	<u>EF190927</u>	1	CHINA
H95	1	<u>EF190926</u>	1	CHINA
H96	1	<u>EF190925</u>	1	CHINA
H97	1	<u>EF190924</u>	1	CHINA
H98	1	<u>EF190922</u>	1	CHINA
H99	1	<u>EF184228</u>	1	SWEDEN
H100	1	<u>EF184227</u>	1	SWEDEN
H101	1	<u>EF184226</u>	1	SWEDEN
H102	1	<u>EF064149</u>	1	CHINA
H103	1	<u>EF067852</u>	1	CHINA
H104	1	<u>EF028202</u>	1	CHINA
H105	1	<u>DQ923524*</u>	1AB	BRAZIL (RS)
H106	4	<u>DQ220737</u>	1A	CANADA
		<u>AF201897*</u>	1A	NETHERLANDS
		<u>AY484413</u>	1A	NETHERLANDS
		<u>AY484411</u>	1A	NETHERLANDS
H107	1	<u>DQ220736</u>	1	CANADA
H108	1	<u>DQ220733</u>	1	CANADA
H109	1	<u>DQ910866</u>	1	CHINA
H110	1	<u>DQ910865</u>	1	CHINA
H111	1	<u>DQ534442</u>	1	CHINA

H112	1	<u>DQ364650*</u>	1AB	BRAZIL (MG)
H113	2	<u>DQ218420</u>	1	CHINA
		<u>DQ218419</u>	1	CHINA
H114	1	<u>DQ201642</u>	1	CHINA
H115	1	<u>DQ201641</u>	1	CHINA
H116	1	<u>DQ201640</u>	1	CHINA
H117	1	<u>DQ201639</u>	1	CHINA
H118	1	<u>DQ206444</u>	1	CHINA
H119	1	<u>AM086384</u>	1	CHINA
H120	1	<u>DQ180392</u>	1	CHINA
H121	1	<u>DQ141322</u>	1A	CHINA
H122	1	<u>DQ104422</u>	1A	CHINA
H123	1	<u>DQ104420</u>	1A	CHINA
H124	2	<u>AY188355</u>	1A	CHINA
		<u>AY256460*</u>	1A	HUNGARY
H125	1	<u>DQ017036</u>	1A	CHINA
H126	1	<u>AY916791</u>	1A	CHINA
H127	1	<u>AY484415</u>	1A	NETHERLANDS
H128	1	<u>AY484412</u>	1A	NETHERLANDS
H129	1	<u>AY484408</u>	1A	NETHERLANDS
H130	1	<u>AY682997</u>	1A	CHINA
H131	1	<u>AY682995*</u>	1B	CHINA
H132	1	<u>AY682993</u>	1A	CHINA
H133	1	<u>AY682992*</u>	1B	CHINA
H134	1	<u>AY732494</u>	1A	CHINA
H135	1	<u>AY691679</u>	1A	CHINA
H136	1	<u>AY678532*</u>	1B	CHINA
H137	1	<u>AY596823</u>	1A	CHINA
H138	1	<u>AY596822</u>	1A	CHINA
H139	1	<u>AY322003*</u>	1A	FRANCE
H140	1	<u>AY322001</u>	1A	FRANCE
H141	1	<u>AY321999</u>	1A	FRANCE
H142	1	<u>AY321998</u>	1A	FRANCE
H143	1	<u>AY321996</u>	1A	FRANCE
H144	1	<u>AY321994</u>	1A	FRANCE
H145	2	<u>AY321993</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321992</u>	1A	FRANCE
H146	1	<u>AY321991</u>	1A	FRANCE
H147	1	<u>AY321989</u>	1A	FRANCE
H148	1	<u>AY321988</u>	1A	FRANCE
H149	1	<u>AY321987</u>	1A	FRANCE
H150	3	<u>AY321986</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321985</u>	1A	FRANCE
		<u>AY321984</u>	1A	FRANCE
H151	1	<u>AY321983</u>	1A	FRANCE
H152	1	<u>AY321982*</u>	1A	FRANCE
H153	1	<u>AY424404*</u>	1A	AUSTRIA
H154	1	<u>AY256457*</u>	1A	HUNGARY

H155	1	<u>AY291318</u>	1A	CHINA
H156	1	<u>AY291316</u>	1A	CHINA
H157	1	<u>AF201311</u>	1A	FRANCE
H158	1	<u>EU755371* #</u>	1AB	BRAZIL (ES)
H159	1	<u>EU755372* #</u>	1AB	BRAZIL (ES)
H160	1	<u>EU755373* #</u>	1AB	BRAZIL (PR)
H161	2	<u>EU755374* #</u>	1AB	BRAZIL (ES)
		<u>EU755375* #</u>	1AB	BRAZIL (SP)
H162	1	<u>EU755376* #</u>	1AB	BRAZIL (MG)
H163	1	<u>EU755377* #</u>	1AB	BRAZIL (SC)
H164	1	<u>EU755378* #</u>	1AB	BRAZIL (BA)
H165	1	<u>EU755379* #</u>	1AB	BRAZIL (ES)
H166	1	<u>EU755380* #</u>	1AB	BRAZIL (SP)
H167	1	<u>EU755381* #</u>	1AB	BRAZIL (SC)
H168	1	<u>AY874165</u>	2D	HUNGARY
H169	1	<u>AY556474*</u>	2	CHINA
H170	1	<u>AY146992*</u>	2	TAIWAN
H171	1	<u>AF201307*</u>	2	GERMANY
H172	1	<u>AB072302*</u>	2A	JAPAN
H173	1	<u>AF109398*</u>	2A	CANADA
H174	1	<u>AF117753*</u>	2A	CANADA
H175	1	<u>AY322004*</u>	2D	FRANCE
H176	2	<u>AY424403*</u>	2D	AUSTRIA
		<u>AY424402</u>	2D	AUSTRIA
H177	2	<u>AY424401*</u>	2D	AUSTRIA
		<u>NC005148</u>	2D	AUSTRIA
H178	1	<u>AY256458*</u>	2D	HUNGARY
H179	1	<u>AY256456*</u>	2D	HUNGARY
H180	1	<u>AY288135*</u>	2D	CHINA
H181	2	<u>AF381176*</u>	2D	CHINA
		<u>AF381175</u>	2D	CHINA
H182	1	<u>AF109399*</u>	2D	CANADA
H183	1	<u>AF264043*</u>	2D	USA
H184	4	<u>AF201305*</u>	2D	GERMANY
		<u>AY874166</u>	2D	HUNGARY
		<u>DQ856568*</u>	2D	BRAZIL (SC)
		<u>EF067853</u>	2D	CHINA
H185	2	<u>AF201306*</u>	2D	GERMANY
		<u>AY672601</u>	2D	SOUTH KOREA
H186	2	<u>EF184223</u>	2D	SWEDEN
		<u>EF184224</u>	2D	SWEDEN
H187	1	<u>DQ870484</u>	2D	USA
H188	1	<u>EF064150</u>	2D	CHINA
H189	1	<u>DQ856572*</u>	2	BRAZIL (SP)
H190	2	<u>AY177626*</u>	1A	CHINA
		<u>AY536756*</u>	1A	CHINA
H191	1	<u>DQ151643*</u>	1C	CHINA

H192	1	<u>AY713470*</u>	1C	GERMANY
H193	2	<u>AY943819*</u>	1C	CHINA
		<u>AY682991*</u>	1C	CHINA
H194	1	<u>AY484410*</u>	1C	NETHERLANDS
H195	1	<u>AY682996*</u>	1C	CHINA
H196	1	<u>AY686765*</u>	1C	CHINA
H197	1	<u>AY686763*</u>	1C	CHINA
H198	1	<u>AY556477*</u>	1C	CHINA
H199	1	<u>AY556476*</u>	1C	CHINA
H200	1	<u>AY556473*</u>	1C	CHINA
H201	1	<u>AY510375*</u>	1C	CHINA
H202	1	<u>AY181947*</u>	1C	CHINA
H203	1	<u>AY181946*</u>	1C	CHINA
H204	1	<u>AY035820*</u>	1C	CHINA
H205	1	<u>AY180397*</u>	2B	TAIWAN
H206	1	<u>AY180396*</u>	2B	TAIWAN
H207	1	<u>AY146993*</u>	2B	TAIWAN
H208	1	<u>AY146991*</u>	2B	TAIWAN
H209	1	<u>AF364094*</u>	2B	TAIWAN
H210	1	<u>AY256459*</u>	2C	HUNGARY
H211	1	<u>AY256455*</u>	2C	HUNGARY
H212	1	<u>AF201310*</u>	2C	SPAIN
H213	1	<u>AF201309*</u>	2C	SPAIN
H214	1	<u>AF201308*</u>	2C	SPAIN
H215	2	<u>DQ104423*</u>	2E	CHINA
		<u>DQ104421</u>	2E	CHINA
H216	2	<u>DQ104419*</u>	2E	CHINA
		<u>AF264039</u>	2E	USA
H217	1	<u>AY699793*</u>	2E	USA
H218	1	<u>AY325495*</u>	2E	SOUTH AFRICA
H219	1	<u>AY094619*</u>	2E	USA
H220	1	<u>AY181948*</u>	2E	CHINA
H221	1	<u>AF465211*</u>	2E	TAIWAN
H222	1	<u>AF544024*</u>	2E	KOREA
H223	1	<u>AF520783*</u>	2E	SOUTH KOREA
H224	1	<u>AF454546*</u>	2E	SOUTH KOREA
H225	2	<u>AB072303*</u>	2E	JAPAN
		<u>EF524540</u>	2E	CHINA
H226	1	<u>AB072301*</u>	2E	JAPAN
H227	1	<u>AF408635*</u>	2E	CANADA
H228	1	<u>AF381177*</u>	2E	CHINA
H229	1	<u>AF112862*</u>	2E	CANADA
H230	1	<u>AF118097*</u>	2E	CANADA
H231	1	<u>AF264041*</u>	2E	USA

APÊNDICE 1

2. Aprovação junto ao Comitê de Ética para experimentação animal

CONTEÚDO NÃO INFORMADO PELO AUTOR NO FORMATO ELETRÔNICO,
O MESMO ENCONTRA-SE SOMENTE NA DISSERTAÇÃO IMPRESSA NA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UFV