

JOÃO PAULO MACHADO

**UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO CIRCOVIRUS SUÍNO 2
COMO ANTÍGENO NA PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE PARA
APLICAÇÃO NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T
M149u
2009

Machado, João Paulo, 1980-
Utilização da proteína do capsídeo do circovírus suíno 2
como antígeno na produção de soro hiperimune para aplica-
ção na técnica de imunistoquímica / João Paulo Machado.
- Viçosa, MG, 2009.
xvi, 67f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 56-67.

1. Circovírus suíno. 2. Imunistoquímica. 3. Proteínas
recombinantes. 4. Soro hiperimune. I. Universidade Federal
de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.089607

JOÃO PAULO MACHADO

**UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO CIRCOVIRUS SUÍNO 2
COMO ANTÍGENO NA PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE PARA
APLICAÇÃO NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA**

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

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009

Profa. Márcia Rogéria de A. Lamêgo
(Co-orientadora)

Prof. Joaquim H. Patarrovo Salcedo
(Co-orientador)

Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior

Dr. Abelardo Silva Júnior

Profa. Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Orientadora)

In memoriam

À minha irmã,

Lucília aparecida Machado, “Lila”, de
quem até o último dia terei saudade.

Aos meus pais,

Sebastião Machado e Ercília
Pirovani Machado, por darem-me
a vida e as bases para nela
guiar-me.

Aos meus irmãos:

Lúcia, Sebastião, Luciano, Mário, “Mauro”, “Lene”, e Plínio, por retribuírem cada encontro com a magia do companheirismo e da fraternidade que lhes são peculiares.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Marlene Isabel Vargas Vilorio, pela orientação, pela confiança depositada, pelas palavras concisas e pelo exemplo de integridade.

Aos Professores Drs. Márcia Rogéria de Almeida e Joaquim Hernán Patarroyo Salcedo, pela importantíssima co-orientação, por permitirem minha integração no “LIMA” e no “LBCHV” e por se colocarem sempre a disposição, permitindo dessa forma, um grande aprendizado em técnicas de biologia molecular.

Aos Professores Drs. Abelardo Silva Júnior e Laércio dos Anjos Benjamin pela coorientação na elaboração de idéias e nas correções.

À Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e condições oferecidas para que eu desenvolvesse este trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG pelo apoio financeiro ao desenvolvimento da pesquisa

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade a mim concedida de dar continuidade à minha formação profissional e, especialmente à secretária Rose, sempre solícita e com um sorriso no rosto, por mais atarefada que estivesse.

Aos Pós-Graduandos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal, Rafael Locatelli Salgado e Fernanda Miquelito Figueira da silva, respectivamente, pela ajuda na purificação da proteína e realização dos testes de PCR em tempo real.

Aos estagiários: Diego Martins Ávila, Débora Câmara Barcelos e Francisco de Assis Pessoa Júnior, por terem paciência em me acompanhar em diversas fases do trabalho.

Ao Renato Eleotério pela ajuda na correção das referências e na impressão das fotos, além do grande apoio no dia da defesa.

À Juliana Evangelista Bezerril, grande amiga, parceira nos estudos, nos trabalhos e nas festas. Ao meu lado em qualquer circunstância desde o dia da aprovação no Mestrado até a despedida para São Paulo. Obrigado pelos tempos de Viçosa, Jú.

A algumas pessoas que, de formas muito especiais, estiveram ao meu lado: Vinícius Winter Viana, Klédna Portes, Andréia Gomes, Gustavo Moulin, Sandro Amorim, Mariele Krohling, Aline Carvalho, Myrian Nogueira e Sandrinha Moreira.

E, sobre todas as coisas, a Deus, que oferece a preciosidade da vida.

BIOGRAFIA

João Paulo Machado, filho de Sebastião Machado e Ercília Pirovani Machado, nasceu em 24 de setembro de 1980, no Município de Guaçuí-ES, onde iniciou as atividades escolares na Escola Unidocente “Cruzeiro Azul”. Em seguida, fez o ensino fundamental na Escola Antônio Carneiro Ribeiro, começou a cursar o ensino médio na Escola “Monsehor Miguel de Sancts”, o Colégio Polivalente, onde estudou por dois anos até se mudar para Vitória-ES, em 1998, para completar o primeiro grau no Colégio “Núcleo de Educação Orientada”. Neste ano foi aprovado no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Iniciou o curso de graduação em 1999 no Centro de Ciências Agrárias da UFES, em Alegre-ES, e obteve o título de Médico Veterinário em setembro de 2004. Durante sua graduação, dedicou-se principalmente às áreas de Patologia Veterinária e Laboratório Clínico Veterinário. Após a graduação, trabalhou no Instituto de Defesa Agropecuária do Espírito Santo (IDAF) por três anos, desempenhando atividades de defesa sanitária animal. Em março de 2007 foi aprovado no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Neste período, adquiriu conhecimentos em técnicas de biologia molecular e práticas em histopatologia. Defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2009, já aprovado para o Doutorado na mesma área.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	Xvi
ABSTRACT	xvii
1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	01
2. REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA	05
2.1. Aspectos históricos da Circovirose suína	05
2.2. O Circovírus suíno e seus aspectos moleculares	06
2.3. Fisiopatologia	08
2.4. Sinais clínicos	12
2.5. Aspectos patológicos	13
2.6. Diagnóstico	15
3. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Cepa do PCV2 e obtenção do plasmídeo recombinante	18
4.2. Clivagem e extração de DNA plasmidial	18
4.3. Preparação de <i>Escherichia coli</i> BL21 competente	18
4.4. Transformação e preparo do pré-inóculo	19
4.5. Indução da produção da Cap – PCV2 recombinante	20
4.6. Purificação da proteína recombinante	20
4.6.1. Preparo dos corpos de inclusão	21
4.6.2. Cromatografia de afinidade	21
4.7. Confirmação da purificação por SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i>	21
4.8. Diálise	23
4.9. Animais utilizados para obtenção de soro hiperimune	23
4.10. Inoculações da proteína em coelhos	23
4.11. Coleta de amostras	24
4.12. Purificação dos anticorpos pelo método de precipitação de IgG	24
4.13. Verificação da afinidade de ligação por <i>Western Blotting</i>	25

4.13.1. Leitura e interpretação dos resultados	26
4.14. Níveis de anticorpo por ELISA.	27
4.15. Titulação de anticorpos pela técnica de imunocitoquímica	27
4.15.1. Cepa de PCV2	27
4.15.2. Linhagem celular	28
4.15.3. Verificação pelo Western Blotting	28
4.15.4. Preparação e fixação da monocamada de células	28
4.15.5. Bloqueio da monocamada de células	29
4.15.6. Anticorpos e controles negativos	29
4.15.7. Revelação e contracoloração	30
4.15.8. Leitura e interpretação	30
4.16. Amostras de tecidos	30
4.17. Quantificação da carga viral por PCRrt	30
4.18. Processamento histológico	31
4.19. Leitura histopatológica	31
4.20. Preparação das lâminas de vidro por meio de silanização	31
4.21. Padronização da técnica de imunistoquímica	32
4.21.1. Preparo das amostras	32
4.21.2. Reidratação	32
4.21.3. Recuperação antigênica	33
4.21.4. Bloqueio contra ligações inespecíficas	33
4.21.5. Anticorpo primário	34
4.21.6. Lavagens	34
4.21.7. Anticorpo secundário	34
4.21.8. Lavagem	34
4.21.9. Revelação	34
4.21.10. Contracoloração e montagem das lâminas	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Clivagem e purificação de DNA plasmidial	36
5.2. Expressão da Cap – PCV2 recombinante	36
5.3. Purificação da proteína pela cromatografia de Afinidade	36
5.4. <i>Western Blotting</i>	38
5.5. Diálise da proteína expressa	39

5.6. Verificação da titulação por <i>Western blotting</i>	40
5.7. ELISA indireto	43
5.8. Confirmação em cultivos celulares	44
5.9. Padronização da técnica de imunocitoquímica	45
5.10. Imunoistoquímica	48
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mapa de construção do plasmídeo contendo a ORF2	19
Figura 02: Eletroforese em gel de agarose da clivagem e purificação do DNA plasmidial	36
Figura 03: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína purificada da fração solúvel	37
Figura 04: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína purificada dos corpos de inclusão	38
Figura 05: <i>Western blotting</i> da proteína recombinante purificada	39
Figura 06: <i>Western blotting</i> com soro pré imune	41
Figura 07: <i>Western blotting</i> com soro hiperimune	42
Figura 08: ELISA Indireto	43
Figura 09: <i>Western blotting</i> de lisados celulares	44
Figura 10: Esquema das diferentes titulações testadas na imunocitoquímica para o anticorpo primário e secundário	45
Figura 11: Técnica de imunocitoquímica	47
Figura 12: Resultado do teste imunocitoquímico	51
Figura 12: Controles positivo e negativo do teste imunocitoquímico	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do teste imunoistoquímico e da carga viral pela PCRrt	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius
µg: micrograma
µL: microlitro
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
Cap: proteína do capsídeo
CD: grupo de diferenciação de linfócitos
cm²: centímetro quadrado
DAB: diaminobenzidina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DO: densidade óptica
dsDNA: DNA de fita dupla
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ensaio imunoenzimático
ICVT: Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IFN: interferon
IgG: imunoglobulina de classe G
IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb: quilobases
KDa: quilodalton
LB: meio Luria-Bertani
LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
LIMA: Laboratório de Infectologia Molecular Animal
MHC: complexo de histocompatibilidade maior
mL: mililitros
nm: nanômetros
ORF: fase de leitura aberta
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb: pares de base
PBS: tampão fosfato salino
PCR: reação de polimerase em cadeia
PCV: circovirus suíno
PDNS: síndrome dermatológica e nefropática suína

PK: células de rim suíno

PMWS: síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame dos leitões

PNP: pneumonia proliferativa necrosante

PPV parvovirus suíno

PRRS: síndrome reprodutiva e respiratória suína

PRRSV: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína

Rep: proteína de replicação viral

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SDS: sistema descontínuo de separação

SPF: sistema livre de patógenos

TB: meio Terrific Broth

TBS: tampão Tris-salino

RESUMO

MACHADO, João Paulo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009.
Utilização da proteína do capsídeo do circovirus suíno 2 como antígeno na produção de soro hiperimune para aplicação na técnica de imunoistoquímica. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Coorientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

A proteína do capsídeo do circovirus suíno 2 (PCV2), codificada pela ORF2, é uma proteína estrutural, sendo altamente imunogênica. Anti-soro produzido a partir dessa proteína recombinante purificada, em coelhos, poderá apresentar as mesmas propriedades daquele produzido a partir de partículas virais purificadas e ser de relevância como ferramenta diagnóstica. O objeto do presente estudo foi padronizar uma técnica de imunoistoquímica, a partir da produção de um soro hiperimune anti-PCV2 em coelhos, utilizando como antígeno a proteína recombinante purificada do capsídeo do PCV2 (Cap PCV2). A proteína foi expressada em *Escherichia coli* BL21 e purificada por cromatografia de afinidade. Inoculações desta proteína foram realizadas em coelhos e os soros foram colhidos para avaliações por *Western blotting*, ELISA, imunocitoquímica e imunoistoquímica. Obteve-se sucesso na purificação da proteína recombinante e na produção do soro hiperimune em coelhos. A afinidade de ligação do anticorpo produzido ao antígeno (proteína recombinante) foi demonstrada pela técnica de *Western blotting* e ELISA e foi considerada eficiente e sensível. As técnicas de imunocitoquímica e imunoistoquímica apresentaram resultados considerados satisfatórios. O anticorpo produzido contra a proteína codificada pela ORF2 mostrou ter boa afinidade de ligação, podendo ser empregado como ferramenta diagnóstica.

ABSTRACT

MACHADO, João Paulo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Use of the porcine circovirus 2 capsid protein as antigen on the hyperimmune serum production for application on immunohistochemistry.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vitoria. Co-Advisors: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

The porcine circovirus 2 (PCV2) capsid protein, encoded by ORF2, is a structural protein and highly immunogenic. An antiserum produced from the purified recombinant protein in rabbits, may present the same properties as that produced from purified viral particles and may be of relevance as a diagnostic tool. The aim of this study was the immunohistochemistry technique standardization from the production of an anti-PCV2 hyperimmune serum in rabbits using as antigen the purified recombinant protein from the capsid of PCV2 (Cap PCV2). The protein was expressed in BL21 *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. Inoculations of this protein were performed in rabbits and the sera were collected for evaluation by *Western blotting*, ELISA, immunocytochemistry and immunohistochemistry. The recombinant protein purification and hyperimmune serum production in rabbits was achieved successfully. The antibody-binding affinity to the antigen (recombinant protein) was demonstrated by *Western blotting* and ELISA techniques and were considered efficient and sensitive. The immunocytochemistry and immunohistochemistry techniques results were considered satisfactory. The antibody produced against the protein encoded by ORF2 showed can be used as a diagnostic tool.

1- JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA

A carne suína é a mais produzida e consumida no mundo, respondendo por cerca de 50% do consumo global de carnes. Sua produção apresentou entre 2000 e 2007 crescimento médio anual de 3,5%, com estimativas de atingir valores recordes para os próximos anos (SILVEIRA e TALAMINI, 2007). A cadeia produtiva de suínos no Brasil tem apresentado expressivo crescimento na produção e nas exportações. É uma cadeia bem organizada, onde as operações, desde a produção dos animais até a comercialização nos mercados interno e externo, têm tido boa coordenação das agroindústrias, sendo tão moderna quanto a realizada nos países desenvolvidos e produtores tradicionais (ABIPECS, 2007). Além disso, se posiciona entre as mais dinâmicas do país, pelos efeitos positivos e multiplicadores que causam nas cadeias de insumos, em especial do milho, soja e rações em geral, bem como nos setores de industrialização, transporte, indústria química e biológica, serviços, entre outros (UBA, 2007).

No decorrer das últimas décadas, um fator relevante foi o controle de doenças com impacto na produção, importantes para a produtividade do setor e sustentabilidade da cadeia. Merece destaque a série de estudos realizada para identificar os fatores de risco envolvidos com a ocorrência de problemas sanitários complexos em todas as fases de produção de suínos e o desenvolvimento de proposições para evitá-los ou atenuá-los (MORÉS, 1995).

Atualmente, entre as doenças que afetam a suinocultura a requerer grande atenção da pesquisa mundial está o estudo das alternativas de controle da circovirose suína, enfermidade que imunodeprime os animais, tornando-os suscetíveis a outras infecções. O custo da produção devido a esta doença cresce em função da mortalidade, perda de peso, piora na conversão alimentar e necessidade do uso de medicamentos (SILVEIRA e TALAMINI, 2007).

A circovirose suína é uma doença infecto-contagiosa causada pelo circovirus suíno 2 (PCV2). Ela se manifesta sob diversas formas clínicas (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007). A tendência nos últimos anos é de que todas as doenças relacionadas ao PCV2 sejam reunidas dentro de uma única classificação, qual seja: doenças associadas ao PCV2. Isso se deve ao fato de os sinais clínicos das diferentes formas de apresentação da doença se entrecruzarem (RAMAMOORTHY e MENG, 2008)

O circovírus suíno 1 (PCV1) foi identificado pela primeira vez como um contaminante de cultivo de células renais de suínos (células PK-15) por Tischer et al. (1974). O PCV2 foi identificado na década de 90 e subsequentemente, diagnosticado como causador de doença clínica em diversos países (FRANÇA et al., 2005). No Brasil, a primeira identificação do agente foi realizada por Ciacci-Zanella no ano de 1999 (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003) e, a partir desse ano, as manifestações clínicas associadas ao PCV2 têm sido freqüentes e comuns nas principais regiões produtoras de suínos do Brasil. Em Minas Gerais, a presença do PCV2 foi detectada em 2002 pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) (MONNERAT, 2003). Isolados deste agente infeccioso também foram descritos nos Estados, São Paulo (CASTRO et al., 2003), Rio Grande do Sul (BARCELLOS e PESCADOR, 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA, 2004) e Espírito Santo (CHIARELLI NETO et al., 2006).

Embora não exista nenhum estudo que revele a prevalência da circovirose suína no Brasil, estima-se que os impactos econômicos da doença ainda têm sido subestimados. Em um estudo realizado na região sul do Brasil, índices de mortalidade variando entre 2% a 10 % foram encontrados. Em 2003, a ocorrência foi estimada em 62% nas unidades produtoras de leitão (UPL) e 66,7% nas unidades de terminação. Estes dados levam a uma estimativa de prejuízo em torno de 33 milhões de reais por ano apenas para a região sul do Brasil (MORÉS, 2007). O vírus está distribuído em todo o mundo onde a suinocultura é praticada (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007). Em outros países, mais especificamente no Reino Unido e França, foi observado um impacto econômico da doença caracterizado por queda de 15% no crescimento por animal, aumento dos custos com serviços veterinários, consumo adicional de ração e custos com desperdício de carcaças (BURCH, 2008).

Considerando que o vírus está amplamente difundido em criações de suínos e que muitos animais, apesar de estar infectados, são assintomáticos, o diagnóstico definitivo das doenças associadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados pela doença (ALLAN e ELLIS, 2000). Portanto, a identificação viral em amostras clínicas é fundamental para o diagnóstico correto da enfermidade. Estudos utilizando a proteína do capsídeo como antígeno alvo nos testes de diagnóstico já vem sendo descritos na literatura (LIU et al., 2005). Os métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ*, imunistoquímica, ensaios de imunofluorescência e reação em cadeia da polimerase (ELLIS et al., 1998, 1999; MOROZOV et al., 1998; ALLAN et al., 1999).

Estudos anteriores mostraram que anticorpos policlonais anti-PCV2 não possuem reatividade cruzada em testes de imunistoquímica frente ao circovirus suíno 1 (PCV1) (SHUAI et al., 2008; HIRAI et al., 2006). Este vírus é considerado não patogênico, geneticamente e sorologicamente diferente de isolados de PCV2 (HAMEL et al., 1998).

Atualmente, com a utilização de técnicas de biologia molecular, é possível a clonagem gênica e a expressão heteróloga de proteínas de interesse biotecnológico. Um alvo interessante nos vírus são as proteínas do capsídeo, por estarem expostas e geralmente serem usadas como imunógenos. A clonagem do gene do capsídeo permite que quantidades virtualmente ilimitadas da proteína sejam produzidas (BARBIERI et al., 2004; COLINET et al., 1994). Uma vez que a proteína capsidial do PCV2, codificada pela segunda fase de leitura aberta (ORF2), é uma proteína estrutural, sendo altamente imunogênica, um anti-soro produzido a partir da proteína recombinante do capsídeo viral purificada deve apresentar as mesmas propriedades daquele produzido a partir de partículas virais purificadas (JU et al., 2005).

A produção de um soro hiperimune anti-PCV2 em coelhos, a partir da proteína recombinante purificada do capsídeo do PCV2 (Cap PCV2), pode significar uma ferramenta diagnóstica de relevância. Desde que este soro tenha capacidade de identificar antígenos virais em lesões, ou mesmo em tecidos normais de suínos, diversas técnicas de identificação de antígenos diretas e

indiretas podem ser desenvolvidas, incluindo-se técnicas de imunoensaio enzimático (ELISA), *Western blotting*, imunistoquímica e imunocitoquímica. Técnicas imunistoquímicas padronizadas, utilizando como anticorpos primários anti-Cap PCV2 podem ser importantes para o diagnóstico da circovirose suína por meio da identificação direta de antígenos virais em lesões histológicas. O emprego desta técnica em cultivos celulares (imunocitoquímica) utilizando esta proteína recombinante pode representar valiosa ferramenta para confirmar a eficácia de cultivo do PCV2 em linhagens celulares. A utilização do anticorpo produzido a partir da proteína recombinante pode ser menos onerosa comparada aos anticorpos comerciais, considerando que estes anticorpos possuem alto custo e são importados.

Este estudo teve como objetivo produzir soro hiperimune anti-Cap PCV2 em coelhos, utilizando como antígeno a proteína recombinante do capsídeo do PCV2 purificada, e utilizar este soro como ferramenta diagnóstica na padronização de técnica de imunistoquímica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos históricos da circovirose suína

Em 1974, foi descoberta a existência de um pequeno vírus contaminante da linhagem celular PK-15, derivada de rim suíno, denominado circovírus suíno (PCV) (TISCHER et al., 1974).

No ano de 1991, foi descoberta no Canadá, uma doença desconhecida até então, a qual foi denominada síndrome multissistêmica do definhamento pós-desmame (PMWS) (HARDING, 1997). Em 1997, descobriu-se uma correlação desta nova doença com o PCV2 (CLARK, 1997); a mesma correlação havia sido estabelecida um ano antes nos Estados Unidos (DAFT et al., 1996). Subsequentemente, uma nova entidade também associada ao circovírus suíno foi descrita na Inglaterra, denominada síndrome nefropática e dermatológica suína (PDNS), (SMITH et al., 1993).

Em 1998, o genoma do PCV associado à PMWS foi totalmente sequenciado, e diferenças importantes, do ponto de vista genômico, entre esse vírus patogênico e o associado à linhagem celular PK-15, foram observadas (HAMEL et al., 1998). Devido a isso, decidiu-se renomear esses dois vírus como circovírus suíno 1 (PCV1), o vírus contaminante da linhagem celular PK-15, derivada de rim de suíno, o qual é apatogênico para suínos e circovírus suíno 2 (PCV2), como agente etiológico da PMWS (ALLAN et al., 1998) e da PDNS (SMITH et al., 1993).

Em 1999, diagnosticou-se a PMWS no Brasil, primeiramente em Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2000), contudo, estudos retrospectivos indicaram a presença do vírus no país desde 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2004).

2.2. Aspectos gerais e moleculares do PCV2

O PCV é um pequeno vírus não envelopado que contém uma fita simples de DNA de 1,76 Kb. O PCV é classificado dentro da família *Circoviridae*, a qual possui outros membros. Os vírus incluídos nesta família são vírus pequenos, icosaédricos e não-envelopados. Pelo fato do PCV ser um vírus animal a apresentar um genoma circular de ácido desoxiribonucleico (DNA), o novo nome foi proposto e passou a constituir um novo gênero, denominado *Circovirus* (TISCHER et al., 1982). Mais tarde, o agente foi agrupado pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICVT) em uma nova família de vírus de DNA, a família *Circoviridae* (LUKERT et al., 1995), que se constituiu de dois gêneros. O primeiro é o gênero *Circovirus*, onde estão incluídos o PCV1 e o PCV2 (ALLAN e ELLIS, 2000), o circovirus do pombo (CoCV), o circovirus do canário (CaCV), o circovirus do ganso (GoCV) e o vírus da Doença do bico e penas dos psitacídeos (PBFDV) (TODD, 2004). O outro é o gênero *Gyrovirus*, no qual está inserido o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) (TODD, 2004). O *Circovirus* apresenta semelhanças com outros dois vírus humanos, o TT vírus (TTV) e o TTV-like minivírus (TLMV) (BIAGINI, 2004), e também com vírus de plantas, incluindo aqueles que infectam o trevo subterrâneo, côco e banana (MEEHAN et al., 1997).

O PCV é resistente à inativação pós-exposição a pH 3,0, clorofórmio e a temperaturas variando de 56 °C a 70 °C. Possui um gradiente de densidade em cloreto de cério (CsCl) de 1,33-1,34 mg/mL e um coeficiente de sedimentação de 57S comparado ao coeficiente de sedimentação do enterovírus bovino (ALLAN et al., 1994b).

Os genomas do PCV1 e do PCV2 contêm 1759pb e 1768pb, respectivamente (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1997), organizados de forma similar e possuem 76% de identidade entre si. Ambos contêm três principais fases de leitura aberta (ORFs): ORF1, ORF2 e, recentemente, foi identificado um produto gênico expresso pela ORF3 (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1997; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998; LIU et al., 2005). O PCV2 é dividido em dois grupos (1 e 2), com oito subgrupos (1A a 1C e 2A a 2E) não estando aparentemente associados com a doença e com a área geográfica. Genomas do grupo 1 foram publicados após o ano de 2003 e

genomas do grupo 2 antes deste mesmo ano, indicando que o grupo 1 seria mais recente que o grupo 2 (OLVERA et al., 2007).

A ORF1 codifica uma proteína associada à replicação (proteína Rep). (NAWAGITGUL et al., 2000). As ORF1 do PCV1 e PCV2 possuem 936pb e 942pb, respectivamente (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1997) e identidade de 85% (CASTRO et al., 2003). A estrutura tridimensional da proteína Rep foi recentemente elucidada por Ressonância Magnética Nuclear. A proteína Rep apresenta um motivo de endonuclease similar ao do geminivírus *Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus*, um vírus de planta que se replica por círculo rolante (VEGA-ROCHA et al., 2007). O PCV também se replica por círculo rolante no núcleo da célula infectada pela formação de uma fita dupla de DNA 29 (RF dsDNA). A proteína Rep é a responsável pela clivagem do DNA viral formando um terminal 3'-OH livre que será o sítio de início para a replicação. A replicação *in vitro* do DNA do PCV mostra ser dependente das enzimas da fase estacionária (S) do ciclo de crescimento celular. A replicação somente se inicia após a passagem da célula pela mitose (TISCHER et al., 1995). Durante a fase G1 do ciclo de crescimento celular, o fator de ativação AP-1 é produzido e este se liga especificamente a seqüência consenso TGA (C/G) TCA. A seqüência TGAGTCT, que é similar ao sítio de ligação AP-1, é identificada no genoma do PCV (FRANZA et al., 1988).

A ORF2 codifica uma proteína que possui uma seqüência conservada de aminoácidos básicos no terminal amínico, sendo envolvida na formação do capsídeo viral, conseqüentemente, é a principal proteína estrutural e imunogênica do PCV2 (NAWAGITGUL et al., 2000). A proteína codificada pela ORF2 (Cap) do PCV2 possui aproximadamente 30kDa (HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998). A proteína Cap é a proteína mais variável do PCV2, podendo haver uma ligação entre a variação da proteína do capsídeo e a patogenicidade do PCV2 (TODD et al., 2004). Entretanto, a ORF2 mostrou ser um bom marcador para estudos filogenéticos e epidemiológicos com o PCV2 já que é possível reconstruir a mesma árvore filogenética produzida pelo genoma viral inteiro do PCV2 (OLVERA et al., 2007).

Reações entre soros de suínos anti-PCV2 e peptídeos sintéticos revelaram que há quatro regiões lineares imunodominantes na Cap PCV2,

incluindo uma região reativa comum à Cap PCV1 (MAHE et al., 2000). As regiões de aminoácidos correspondentes às posições 47-85, 165-200 e 230-233 estão envolvidos na formação dos epítomos imunorreativos (LEKCHAROENSUK et al., 2004). Os primeiros 46 resíduos de aminoácidos da cápside viral correspondem a aminoácidos básicos e não estão envolvidos na formação conformacional dos epítomos (HAMEL et al., 1998). Estes resíduos podem estar envolvidos na formação da superfície interna da proteína que interage com as cargas negativas do DNA viral durante a montagem do vírus (LEKCHAROENSUK et al., 2004). Recentemente, foi realizado mapeamento detalhado dos epítomos antigênicos da Cap PCV2, onde descobriu-se que os três epítomos lineares, os aminoácidos 156-162, 179-192 e 195-202, são confirmados nas duas regiões imunoreativas dos resíduos aminoácidos 157-183 e 193-207 (SHANG et al., 2009).

Técnicas imunoistoquímicas têm sido padronizadas e empregadas em tecidos de suínos com anticorpos produzidos contra a proteína codificada pela ORF2 (HA, et al., 2005; PARK et al., 2009). A proteína Cap é relatada como indutora de resposta imune protetora em suínos vacinados com produtos do DNA da ORF2 expressados em *Baculovirus* (KAMSTRUP et al., 2004). Vacinas com subunidades da ORF1 e ORF2 foram desenvolvidas e promoveram proteção significativa contra infecção ao PCV2. Silva Júnior et al. (2009) utilizaram como candidato vacinal plasmídeo recombinante expressando a proteína estrutural, codificada pela ORF2 do PCV2, o qual demonstrou ser capaz de induzir uma resposta humoral e celular nos camundongos BALB/c inoculados.

A proteína codificada pela ORF3 está envolvida na indução de apoptose em cultivo celular (LIU et al., 2005). Estudos com camundongos revelaram que a ORF3 está diretamente relacionada à patogênese viral *in vivo* (LIU et al., 2006).

2.3. Fisiopatologia

As bases patogênicas da qual o PCV2 é associado à PMWS ainda são pouco esclarecidas. De fato, a relação entre o PCV2 e algumas manifestações de agravo tem sido estabelecida não somente na presença do vírus como agente causal único da doença, mas também quando esse vírus atua em

associação com outros patógenos (SEGALES et al., 2004). Os genótipos 1 e 2 do PCV2 foram definidos recentemente usando a proteína do capsídeo do PCV2 como marcador, os resultados sugerem que o genótipo 1 pode ser potencialmente mais patogênico que o genótipo 2 (GRAU-ROMA et al., 2008)

Alguns autores têm argumentado a necessidade de uma co-infecção ou co-fatores para o desenvolvimento da doença (ALLAN et al., 1999; CHOI e CHAE, 2000; ALLAN e ELLIS, 2000; KRAKOWKA et al., 2001; KYRIAKIS et al., 2002). A PMWS tem sido associada à combinação do PCV2 com outros patógenos virulentos, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), vírus da influenza suína, parvovírus suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (KIM et al., 2002; PALLARES et al., 2002). Estas infecções podem confundir e complicar a apresentação clínica da doença.

Segundo Fernandes et al. (2006), a manifestação de sinais clínicos e lesões associadas com a PMWS ocorreram de forma leve em leitões SPF infectados com PCV2. No entanto, o PCV2 foi detectado em outros órgãos, com um maior número de lesões histopatológicas e em maior proporção nos suínos co-infectados com PPV, quando comparados aos infectados somente com PCV2, reforçando a hipótese de que a infecção por PCV2 pode ser acentuada pela co-infecção por PPV.

Exames hematológicos revelaram uma redução de linfócitos T do grupo de diferenciação 4+ (CD4+) e células B, resultando em um quadro de depleção linfóide nos animais doentes (SEGALES et al., 2001). Os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de IL-1 α e IL-10 demonstraram estar aumentados nos animais afetados, e níveis de mRNA de IL-2 e IL-2R α (CD25) parecem sofrer uma redução (SIPOS et al., 2004). Análises na cinética celular mostraram uma linfopenia conseqüente da diminuição de linfócitos B CD21⁺ e linfócitos T CD3⁺. Todas as sub-populações de linfócitos Th de memória CD3⁺CD4⁺CD8⁺, Th “naive” CD3⁺CD4⁺CD8⁻, células Tc CD3⁺CD4⁻CD8⁺ e células $\gamma\delta$ TCR⁺ CD3⁺CD4⁻CD8⁻ foram susceptíveis a infecção pelo PCV2. As células NK CD3⁻CD4⁻CD8⁺ foram também diminuídas nos animais afetados com PMWS (NIELSEN et al., 2003).

Chang et al. (2005) não detectaram nenhuma morte celular significativa e nenhuma replicação do PCV2 em macrófagos alveolares de suínos, entretanto, eles mostraram que o PCV2 sozinho foi capaz de causar uma significativa falha funcional nos macrófagos alveolares, incluindo uma diminuição transiente da fagocitose e uma redução persistente na capacidade microbicida. Além disso, os macrófagos inoculados com o PCV2 também foram ineficazes na produção de radicais livres pró inflamatórios óxidos (O_2^-) e peróxidos (H_2O_2).

Macrófagos podem carrear o PCV2 em suínos infectados, e embora não apresente citotoxicidade direta, o PCV2 pode impedir a capacidade de expressão de várias citocinas que associada a um decréscimo na atividade microbicida dependente de oxigênio, permite infecção por patógenos secundários ou oportunistas nos pulmões. Várias citocinas e quimiocinas são super-reguladas, podendo intensificar o estresse respiratório e agravar a pneumonia intersticial por aumento de reações inflamatórias e recrutamento adicional de células fagocitárias inflamatórias mononucleares para os pulmões (CHANG et al., 2006a).

As populações de leucócitos principalmente envolvidas na patogênese da síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) são os neutrófilos, monócitos e células T citotóxicas. Células T $\gamma\delta$ estão também implicadas na resposta inflamatória e imune inicial e também podem ser de grande importância na PDNS (SIPOS et al., 2005).

Hasslung et al. (2003) mostraram que um dos cinco oligonucleotídeos (ODNs) selecionados do genoma do PCV2 continha motivos CpG e exibiam uma atividade inibitória na produção de $INF-\alpha$ por células mononucleares sanguíneas periféricas, e que os outros quatro motivos CpG possuíam efeitos estimulatórios na produção de $INF-\alpha$. Porém, Chang et al. (2005) constataram o aumento na produção de $INF-\alpha$ em macrófagos alveolares *in vitro*. Sipos et al. (2004) verificaram um decréscimo na produção de $INF-\gamma$ em células periféricas sanguíneas. A entrada do PCV2 na célula depende da via de endocitose mediada por clatrina em monócitos 3D4/31, requerendo uma acidificação do endossomo para a infecção. Além disso, também depende dos filamentos de actina, visto que inibidores da polimerização de actina diminuem

a taxa de infecção nessas mesmas células (MISINZO et al., 2005). Chang et al. (2006b) indicaram que lipopolissacarídeos bacterianos induzem a translocação do PCV2 para o núcleo da célula, etapa necessária para a replicação viral.

Infecção de células produtoras de interferons naturais impede a indução de interferon (IFN)- α e fator de necrose tumoral por oligonucleotídeos (CpG), impedindo a maturação autócrina e parácrina de células dendríticas mielóides. Esta inibição celular é mediada por DNA viral, independente de replicação. Um amplo espectro de inibição foi detectado, afetando respostas induzidas por agonistas de receptores “*toll-like*” TLR7 e TLR9, mostrando que o DNA do PCV2 pode induzir sinal negativo dominante capaz de influenciar o reconhecimento de cascatas de ativação de receptores induzidos, sugerindo deste modo, uma nova via de modulação de resposta imune inata (VINCENT et al., 2007).

O perfil de expressão sistêmica das citocinas em suínos acometidos de PDNS apresentou características importantes em nível de mRNA e proteínas. Nesses animais, foi observado significativo aumento dos mRNAs codificadores das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 (SIPOS et al., 2005). Kim e Chae, (2004) detectaram a expressão de MCP-1 e MIP-1 antes da inflamação granulomatosa, sugerindo que as quimiocinas MCP-1 e MIP-1 podem ter um papel central em mediar a inflamação granulomatosa em linfonodos infectados pelo PCV2.

O PCV pode replicar em culturas de macrófagos e monócitos de bovinos e suínos (ALLAN et al., 1994a). Em culturas de macrófagos alveolares de suínos o PCV não afeta a habilidade da célula em fagocitar e eliminar células que estão acopladas ao complemento ou que expressam receptores Fc para ligação de imunoglobulinas. McNeilly et al. (1996) observaram um aumento transiente no complexo de histocompatibilidade (MHC) da classe I em células infectadas com PCV e uma diminuição na expressão de MHC classe II. Um estudo preliminar mostrou que o PCV2 pode causar viremia e que o vírus pode replicar em fetos causando morte fetal e mumificação. Esses dados mostraram a incapacidade de animais severamente afetados pelo PCV2 de apresentar uma resposta imune eficiente, entretanto, não está totalmente claro como o vírus atua sobre as células do sistema imune de animais infectados (PENSAERT et al., 2004).

Liu et al. (2006) mostraram que vírus mutantes que não expressam a proteína codificada pela ORF3 não promovem lesões evidentes, mas replicam eficientemente em camundongos e resultam na diminuição de linfócitos T, demonstrando que a proteína codificada pela ORF3 tem papel importante na patogênese viral via atividade apoptótica. PCV2 foi associado com apoptose no baço, linfonodos e placa de Peyer de camundongos BALB/c infectados.

2.4. Sinais clínicos

A PMWS é a síndrome mais importante causada pela infecção do circovírus suíno (HARDING, 2004). Os sinais clínicos que formam a base para o diagnóstico preliminar são perda de peso, dispnéia, aumento dos linfonodos, diarreia, palidez da pele e icterícia (CONTTRELL et al., 1999; HARDING, 1997; HARDING et al., 1998; HARMS, 1999). Os sinais clínicos da PMWS são tipicamente encontrados em animais de 7 a 15 semanas de idade (HARDING et al., 1998).

A síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS) é uma doença que afeta animais de 1,5 a 4 meses de idade (SMITH et al., 1993; THIBAUT et al., 1998). Nos casos fatais, são observadas lesões cutâneas que consistem em vasculite necrotizante que afetam a derme, levando a uma necrose subcutânea e úlceras hemorrágicas dermais (CHOI e CHAE, 2001; THIBAUT et al., 1998). Entretanto, podem variar de discretas lesões de 1 cm de diâmetro ou menos, multifocais, eritematosas e planas para grandes lesões coalescentes que ocorrem em todas as partes do corpo mas, particularmente em membros posteriores, períneo, abdômen ventral e flancos. Nos primeiros estágios as lesões discretas têm uma margem irregular e o eritema é mais intenso, dando uma aparência de roseta. Já nos casos em que há progressão severa, as lesões evoluem de coloração púrpura para preta, consistente com a necrose dermal. Os casos graves geralmente são fatais e, em quadros menos severos pode haver recuperação entre 10 a 14 dias, resultando em normalidade da pele ou formação de áreas de escaras (THOMSON et al., 2002).

O tremor congênito em suínos é causado pela desmielinização da medula cerebral e espinhal. A mortalidade pode alcançar taxas acima de 50%, como resultado da incapacidade motora do animal. A associação do PCV2 ao tremor congênito é controversa (KENNEDY et al., 2003; CHAE, 2004).

A pneumonia necrotizante proliferativa (PNP) foi inicialmente descrita em 1990 no Canadá, como um problema respiratório em animais de creche e terminação, podendo ser causada pelo vírus influenza A (GIRARD et al., 1992). Entretanto, outros estudos mostraram que a PNP pode ser resultado da co-infecção do PRRSV e PCV2 (OHLINGER et al., 2000).

Existem estudos da associação do PCV2 a falhas reprodutivas. Os indicadores clínicos em granjas afetadas incluem elevadas taxas de abortos, retorno ao cio e mumificação fetal (JOSEPHSON e CHARBONNEAU, 2001; KIM et al., 2004; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001; WEST et al., 1999).

2.5. Aspectos patológicos

O aumento dos linfonodos (principalmente o inguinal, submandibular, mesentérico e mediastinal) é uma das alterações patológicas mais comuns de animais com PMWS. Em menor proporção de ocorrência, os linfonodos podem apresentar áreas de necrose multifocal visíveis macroscopicamente. Uma porcentagem de animais afetados pela PMWS pode apresentar também atrofia e descoloração hepática, principalmente em casos de ocorrência de icterícia tipicamente evidente, e o córtex renal com focos de necrose (SEGALES e DOMINGO, 2002).

Do ponto de vista microscópico, a depleção linfóide das áreas foliculares e parafoliculares associada a um infiltrado de células histiocitárias em órgãos linfóides em geral são as lesões comuns encontradas em animais afetados. A presença de células gigantes multinucleadas nos órgãos linfóides também é freqüente. Outro achado importante relacionado aos órgãos linfóides é a presença de corpúsculos de inclusão basofílicos e esféricos no citoplasma de células histiocitárias. Nas áreas parafoliculares, observa-se uma proliferação do estroma fibro-vascular (ROSELL et al., 1999). No fígado pode ser encontrada uma hepatite linfocitária ou linfo-histiocitária periportal. Nos rins é freqüente o achado de nefrite intersticial linfocitária ou ainda glomerulonefrite severa com deposição de fibrina na cápsula de Bowmann. Nos pulmões, o achado mais freqüente é a pneumonia intersticial caracterizada por marcado espessamento dos septos alveolares por infiltrado mononuclear, podendo haver a presença de neutrófilos degenerados no interior dos alvéolos (SEGALES et al., 2004;

DARWICH et al., 2004). O desenvolvimento de pneumonia intersticial em suínos acometidos naturalmente pela PMWS ou experimentalmente infectados com PCV2 pode ser resultante do recrutamento de células inflamatórias da fase aguda, e subsequente, de células fagocíticas mononucleares dos vasos sanguíneos para os septos interalveolares e espaço alveolar pela super expressão de citocinas e quimiocinas liberadas pelos macrófagos infectados com PCV2 (CHANG et al., 2005).

Na PDNS, as lesões renais microscópicas variam na cronologia de vasculite e glomerulite agudas e necrotizantes, com cristais hialinos nos túbulos renais para esclerose glomerular crônica, com fibrose e inflamação intersticial. A dermatite hemorrágica está associada à vasculite necrotizante nos vasos dermais. A vasculite pode ser detectada em outros tecidos, incluindo subcútis, linfonodos, baço, fígado, membrana sinovial das articulações, submucosa gastrintestinal, serosas e meninges, mas esta distribuição e frequência varia consideravelmente entre animais acometidos (THOMSON et al., 2002).

Lesões cardíacas que consistem em hemorragia do miocárdio e necrose de células cardíacas e lesões vasculares como perivasculite linfo-histiocitária ou endoarterite com necrose de células endoteliais também são relatadas por Opriessnig et al. (2005). É possível encontrar lesões no sistema nervoso central como meningoencefalite linfo-histiocitária, além de proliferação das células da neurógliia (ROSELL et al., 1999).

Chianini et al. (2003) classificaram as lesões histopatológicas de linfonodos em três estágios ou graus. Nas lesões de estágio I observa-se depleção leve em áreas de linfócitos B, infiltração leve por macrófagos, baixo grau de histiocitose, leve infiltração de células imaturas do sistema mononuclear fagocítico, presença de poucos granulócitos, principalmente eosinófilos, figuras mitóticas e apoptóticas ocasionais, poucas células gigantes multinucleadas, principalmente nos centros germinativos das áreas foliculares dos tecidos linfóides. Nas lesões de estágio II, há depleção linfóide moderada de áreas de células B, leve depleção linfóide nas áreas de células T, macrófagos infiltrados nas áreas foliculares e interfoliculares, presença de moderado número de células gigantes multinucleadas, ocasionalmente granulócitos degenerados, grandes e únicos ou pequenos, múltiplos corpos de inclusões basofílicos esféricos presentes no citoplasma de histiócitos e

macrófagos e numerosas figuras mitóticas. Nas lesões de estágio III, os folículos linfóides estão drasticamente reduzidos ou ausentes. Regiões subcapsulares e interfoliculares invadidas por grande número de macrófagos, alto grau de histiocitose, grandes e únicos ou pequenos e múltiplos corpos de inclusões basofílicos esféricos e intracitoplasmáticos observados ocasionalmente nos histiócitos, células gigantes multinucleadas encontradas espalhadas nas áreas corticais dos linfonodos, figuras mitóticas e apoptóticas ocasionais localizadas nas áreas foliculares, considerável número de granulócitos polimorfonucleares, marcada depleção linfóide tanto nas áreas de células T quanto nas áreas de células B, intenso infiltrado de macrófagos, numerosos eosinófilos encontrados nos tecidos foliculares e interfoliculares numerosas figuras mitóticas, células em apoptose e células gigantes multinucleadas encontradas esporadicamente.

2.6. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões histopatológicas e sinais clínicos causados pela doença (ALLAN e ELLIS, 2000). Não há efeito citopático causado pelo PCV em cultivo celular. Métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ* (IHS), imunistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (ALLAN et al., 1999; ELLIS et al., 1998; ELLIS et al., 1999; MOROZOV et al., 1998), PCR (ALLAN et al., 1999; LAROCHELLE et al., 1999), e análises do polimorfismo dos fragmentos em ensaios de enzimas de restrição (RFLP) (NAYAR et al., 1997).

O ácido nucléico do PCV2 é detectado no citoplasma de histiócitos, de células gigantes multinucleares e outras células da linhagem de macrófagos e monócitos, assim como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas de tecidos linfóides (ALLAN e ELLIS, 2000; ROSELL et al., 1999).

Os diagnósticos diferenciais da circovirose suína podem ser amplos, dependendo dos sinais clínicos apresentados pelos animais da granja. Primeiramente e mais importante é incluir na lista de doenças diferenciais as enfermidades respiratórias, principalmente a PRRS; pois, a soroprevalência do PRRSV é amplamente distribuída em muitos países, o que dificulta a

diferenciação da circovirose suína e da PRRS (SEGALES et al., 2002). Além disso, todas as doenças ou condições que envolvem a refugagem de animais podem ser incluídas na lista de diagnóstico diferencial (HARDING, 1997).

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produção de soro hiperimune anti-Cap PCV2 em coelhos, a partir da proteína recombinante purificada do capsídeo do PCV2, e utilização desse soro para padronização de técnica imunistoquímica.

3.2. Objetivos específicos

- Purificar DNAs plasmidiais previamente clonados com a sequência de nucleotídeos do capsídeo viral no plasmídeo pET 16b (Novagem);
- Induzir e expressar a proteína do capsídeo do PCV2 em sistema bacteriano de expressão;
- Purificar a proteína recombinante por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel;
- Produzir um soro hiperimune anti-Cap PCV2 utilizando a proteína recombinante purificada;
- Purificar imunoglobulinas de classe G (IgG) por método de precipitação;
- Verificar as melhores titulações de anticorpos e antígenos a serem aplicadas em técnicas de Western blotting, ELISA e imunocitoquímica;
- Padronizar técnica de imunistoquímica utilizando como anticorpo, primário de coelho anti-Cap PCV2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepa do PCV2 e obtenção do plasmídeo recombinante

No presente estudo foi utilizada cepa do PCV2 isolada de rim de suíno por Monnerat (2003) e mantida em células SK6 no Laboratório de Virologia Animal (DVT). A caracterização molecular do isolado viral e a construção de DNAs plasmidiais positivos da sequência codificadora da cápside viral foram realizadas no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), em estudo prévio, por Silva Júnior (2005) e Silva Júnior (2008).

4.2. Clivagem e extração de DNA plasmidial

O DNA do plasmídeo pET foi extraído de células utilizando-se *kit* específico para extração de DNA plasmidial (PROMEGA WIZARD® plus SV – minipreps DNA purification system – USA), o qual utiliza metodologia de eluições. Para a realização de clivagem foi utilizada a enzima de restrição *EcoRI*. O produto resultante foi observado em eletroforese de gel de agarose 1% e a confirmação da extração foi feita por meio da verificação de bandas de tamanho molecular esperadas.

4.3. Preparação de *Escherichia coli* BL21 competente

Células não transformadas de *Escherichia coli* mantidas em estoque a – 80 °C com glicerol 12 % foram reativadas para crescimento em meio LB líquido contendo cloranfenicol 17 µg/mL a 37 °C, sob agitação de 180 rpm durante 12 horas. No dia seguinte as células foram diluídas na proporção 1:100 em meio LB e deixadas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, até que o meio de cultura atingisse densidade óptica em espectrofotometria de 0,4 em uma absovância de 600 nanômetros de comprimento de onda (DO₆₀₀). Em seguida, o meio foi distribuído em tubos de 50 mL, que foram deixados no gelo por 5 minutos, antes de serem centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g a 4 °C. Descartado o

sobrenadante, o precipitado resultante foi ressuspensionado em 1/5 do volume inicial de meio com tampão Ca/Glicerol estéril gelado (60 mM CaCl₂, 10 mM PIPES, 15 % de glicerol, pH 6,4). Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi novamente ressuspensionado em tampão Ca/Glicerol com 1/5 do volume inicial de meio e deixado no gelo por 30 minutos. O material foi então centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o precipitado resultante foi ressuspensionado, cuidadosamente, em 1/40 do volume inicial de meio. Finalmente, o material ressuspensionado foi aliqüotado em microtubos (100 µL cada) previamente resfriados no gelo e estocados a – 80 °C.

4.4. Transformação e preparo do pré-inóculo

Um microlitro (1µL) do plasmídeo recombinante pET Cap - PCV2 (Figura 1) contendo o gene da ORF2 do PCV2, construído por Silva Júnior (2008), foi adicionado a 100 µL de células competentes preparadas como descrito anteriormente e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Após este tempo, a mistura de células e DNA plasmidial foi submetida a um choque térmico, em banho-maria a 42 °C por um minuto e, novamente no gelo por dois minutos. Em seguida, 900 µL de meio LB sem antibiótico foram adicionados, as células foram incubadas a 37 °C por 2 horas a 250 rpm e, após este tempo, 100 µL da cultura foram deixados em crescimento durante toda a noite em LB líquido com ampicilina na concentração de 50 µg/mL (pré-inóculo).

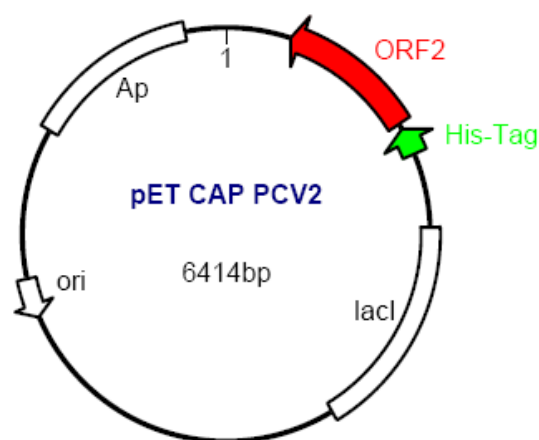


Figura 01: Mapa de construção do plasmídeo contendo a ORF2 do PCV2. Inserção na mesma fase de leitura de uma calda de histidina no vetor de expressão pET-16b, originando o plasmídeo recombinante pET CAP PCV2 (SILVA JÚNIOR, 2008).

O pré-inóculo foi diluído 100 vezes em meio TB (*Terrific Broth*) contendo 50 µg/mL de ampicilina e 20 mM de glicose e deixado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até que a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nanômetros (DO_{600}) atingisse o valor de 0,6 (fase log de crescimento). Logo em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um microtubo novo centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos e o precipitado armazenado para análise por SDS-PAGE. Foram testadas as concentrações 0,1 e 0,25 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (SIGMA-ALDRICH) à temperatura de 30 °C, sempre sob vigorosa agitação (250 rpm) e suficiente aeração. Decorridas quatro horas de crescimento após a indução com IPTG, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos. O precipitado resultante foi recuperado para ser utilizado nos passos seguintes.

4.6. Purificação da proteína recombinante

Após a expressão, as células bacterianas induzidas passaram por um processo de lise para liberação da proteína expressa para que o processo de purificação da proteína do capsídeo do PCV2 (Cap – PCV2) recombinante pudesse ser realizado. O precipitado de células induzidas foi descongelado e ressuspenso em tampão de lise (NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 5 mM; pH 8,0) com cerca de 1 mL para cada grama do precipitado. Ao tampão de lise foram adicionados lisozima 1 mg/mL (SIGMA ALDRICH), PMSF 1 mM (SIGMA ALDRICH) e, em seguida, este foi incubado no gelo por 30 minutos. O processo de lise das células foi realizado com 6 ciclos de sonicação de 10 s a 200-300 W cada, com intervalos de 10 s e com os tubos no gelo para evitar aquecimento da amostra. Os restos celulares e os corpos de inclusão foram precipitados por centrifugação a 10.000 x g a 4 °C por 30 minutos. O precipitado (corpos de inclusão) foi congelado a -20 °C para posterior purificação e parte do sobrenadante foi coletado para análise em SDS-PAGE.

Diferentes estratégias foram adotadas com o intuito de purificar e obter a maior quantidade possível da proteína recombinante. Cada metodologia de purificação foi repetida pelo menos duas vezes.

4.6.1. Preparo dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão foram ressuspensos com o mínimo de volume possível em três tipos de tampões diferentes: tampão de equilíbrio I (Tris HCl 50 mM; 2 M de uréia; 500 mM de NaCl; pH 8,0), tampão de equilíbrio II (Tris HCl 50 mM; 8 M de uréia; pH 8,0) e tampão de equilíbrio III (Fosfato 100 mM; NaCl 400 mM; Ureia 2 M; Imidazol 10 mM; e Triton x-100 0,1 %; pH 7,5). As amostras foram deixadas no gelo por cerca de 15 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e o precipitado armazenado para posterior análise em gel SDS-PAGE. O material ressuspensado em tampão de equilíbrio I, II ou III foi armazenado na geladeira por no máximo sete dias até a sua utilização nos passos seguinte da purificação.

4.6.2. Cromatografia de Afinidade

Foram adicionados quatro mililitros de água destilada a 500 µL de resina de Níquel (HIS-Select® Nickel Affinity – SIGMA), sendo o material centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Descartado o sobrenadante, quatro mililitros do tampão de equilíbrio foram adicionados para ressuspensão da resina. Após nova centrifugação, a 3.000 x g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi novamente descartado e ao precipitado foram adicionados quatro mililitros dos corpos de inclusão devidamente preparados como descrito no item 4.1.5.3. Estes foram deixados interagindo por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação (50 rpm). Em seguida, a resina foi empacotada na coluna cromatográfica (seringa de 1 mL) e o volume não ligado à resina foi então coletado em um microtubo. Posteriormente, diferentes volumes de tampões de equilíbrio com concentrações de imidazol variando de 10 a 60 mM foram testadas para remoção das proteínas ligadas inespecificamente à resina. Finalmente, a eluição da proteína recombinante foi feita com tampão de equilíbrio contendo de 120 a 250 mM de imidazol.

4.7. Confirmação da purificação por SDS- PAGE e Western blotting

As amostras coletadas em cada condição foram misturadas com tampão de amostra (Tris-Cl 45 mM, pH 6,8; glicerol 10%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,01%, 50 mM de β-Mercaptoetanol) e sonicadas 6 vezes com intervalo de 10 s

no gelo para evitar aquecimento das amostras. Em seguida, as amostras foram fervidas em banho-maria por 3 min e analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante, sistema descontínuo de separação (SDS-PAGE), para verificar bandas de peso molecular correspondentes à da proteína purificada e estimar a eficiência e qualidade da purificação da proteína. As proteínas foram separadas em um gel de poli(acrilamida) 15%, como descrito por Sambrook et al. (1989), usando um sistema de tampão Tris-glicina (Tris 25 mM e Glicina 0,2 M). Após a corrida, o gel foi revelado com solução corante (Commassie Brilhante Blue R-250 (SIGMA-ALDRICH) 0,1%, ácido acético 9%, etanol absoluto 45%) por 2 h e colocado em solução descorante (ácido acético glacial 7,5% e etanol absoluto 25%) até visualização. A correta expressão foi detectada por comparação com o marcador de peso molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas).

Após a purificação e a observação da proteína purificada no SDS-PAGE, foi realizado um *Western blotting* para confirmar se a proteína purificada era realmente a proteína do capsídeo do circovírus suíno 2. Para isso, após um SDS-PAGE 15% de amostras contendo a proteína purificada e de amostras controle, 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 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 que era o anti-soro de suíno anti-PCV adquirido comercialmente (VMRD, Inc.) (1:8000) ou o anti-soro de camundongo anti-cauda de Histidina (SIGMA) (1:3.000) por 3 horas. Depois de três lavagens (com duração de cinco minutos cada lavagem) com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de suíno conjugado à peroxidase produzido em coelho (1:16.000) (SIGMA) ou anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:4.000) (SIGMA) por uma hora. A membrana foi novamente lavada por três vezes (com duração de cinco minutos cada lavagem) e 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 30vol. A reação de revelação foi parada mergulhando a membrana em recipiente com água destilada.

4.8. Diálise

Para remoção da uréia e excesso de outros sais da amostra purificada, a mostra foi colocada em membrana de diálise, com poros que permitiam a passagem de proteínas menores que 16 kDa. A proteína recombinante purificada foi dialisada em tampão fosfato de 20 mM, Triton-X100 0,1% e pH 7,4, sob agitação a 4 °C. O tampão de diálise foi trocado por oito vezes a cada seis a 12 horas. O volume de tampão utilizado para cada troca foi de um litro. A solução final contendo a proteína dialisada foi quantificada pelo método de Bradford e estocada, seguindo condições de armazenamento padronizadas por Salgado (2008).

4.9. Animais utilizados para obtenção de soro hiperimune

Para obtenção do soro pré-imune, foram utilizados dois coelhos, fêmeas, raça Nova Zelândia, albinos, com idade entre 60 a 70 dias, clinicamente saudáveis, oriundos do Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa. Foram coletadas amostras de sangue dos coelhos antes das três injeções (contendo a proteína recombinante Cap-PCV2). Todos os procedimentos que envolveram utilização de animais seguiram as normas do Comitê de Ética do Departamento de Veterinária da UFV, aprovados por este comitê sob protocolo de número 024/2008.

4.10. Inoculações da proteína em coelhos

Para a produção de soro hiperimune em coelho, foram realizadas quatro injeções em cada animal, por via subcutânea, contendo em cada injeção aproximadamente 100 µg da proteína recombinante do capsídeo do PCV2 previamente purificada pela cromatografia de afinidade e dialisada (como descrito no item 4.4). A proteína purificada foi emulsificada com o adjuvante de saponina (N.50508064, Amostra 5012, Bio Science) na proporção de 1 mg/mL de volume de proteína inoculada no animal. Os intervalos entre as aplicações das injeções variaram entre 15 a 20 dias.

4.11. Coleta de amostras

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção venosa da veia auricular dos coelhos. Foram obtidos 5 mL de sangue de cada coelho. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, onde foi mantido até a retração do coágulo, à temperatura ambiente, sendo depois centrifugado a 4427 *g*, a 4 °C por 5 minutos e, então, foi obtido o soro bruto pré-imune. Esse soro foi armazenado em freezer, a -20 °C, para posterior análise do título de anticorpos por *Western blotting* e por ELISA.

4.12. Purificação dos anticorpos pelo método de precipitação de IgG

Após colheita do sangue total dos coelhos e centrifugação do mesmo, foi obtido aproximadamente 50 ml de soro sanguíneo. Este soro foi submetido à técnica de precipitação de imunoglobulinas de classe G (IgG). O volume total de soro obtido foi diluído em quatro volumes de tampão acetato na concentração de 60 mM e pH 4, resultando num volume final de 400 mL de solução. Após a diluição, o pH foi ajustado novamente para 4.5 utilizando-se NaOH 0,1 N. O valor de pH foi ajustado por meio de pHmetro de eletrodo. Foi adicionado lentamente e fracionadamente e sob agitação (durante 30 minutos) à amostra diluída, ácido caprílico na concentração de 25µL por mL de amostra. Após formação de precipitado, a amostra foi centrifugada em tubos “Falcon” a 10.000 *g* por 30 minutos, utilizando-se centrífuga refrigerada a 4°C com rotor A 841. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e misturado em PBS 10X na proporção de 10 partes de sobrenadante para uma parte de PBS. O pH da solução resultante foi ajustado para 7,4 com NaOH 5,0N. O sobrenadante foi refrigerado a 4°C e então foi adicionado sulfato de amônio na proporção de 0,277g para cada mL de sobrenadante (equivalente a 45% de saturação) e mantido sob agitação por 30 minutos. Após, foi realizada centrifugação a 3.000 *g* por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em um volume de PBS 1X, a 4°C, em proporção equivalente ao volume da amostra inicial dividido por 10, nesse caso, resultando em um volume de 3,8 mL de solução final. Em seguida, a amostra ressuscitada foi depositada em membrana de diálise (SIGMA D-0655, 25mm x 40mm, 12.000), a qual foi submersa em dois litros de PBS 1X, este tampão foi trocado por três vezes e a diálise foi realizada *overnight* a 4°C. Terminada a diálise, a amostra

foi retirada da membrana e depositada em recipiente de vidro, onde foi aquecida em banho-maria por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 5000 g a 4°C. Foram feitas alíquotas de 1 mL, as quais foram depositadas em tubos de vidro e armazenadas a -20°C.

4.13. Verificação da afinidade de ligação por *Western blotting*

Para a verificar a afinidade de ligação do anticorpo produzido à proteína purificada foi realizado ensaio por *Western blotting*. Amostras de proteína purificada foram submetidas à eletroforese, em SDS-PAGE, na concentração de 15% e 1 mm de espessura. A eletroforese ocorreu numa cuba eletroforética com uma fonte de alimentação a 100 V, por aproximadamente duas horas. O tampão de corrida eletroforética utilizado foi o tampão 5X (15g de tris-base, 72g de glicina, 5 g de SDS, para 1 L de solução final), que foi diluído para a concentração final de 1X. Foram utilizados 5µL do marcador Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas), para proteínas de 10 a 200 KDa. Como controle negativo foi utilizado 9 µL de extrato lisado de células de *E.coli* BL-21 transformadas com o gene recombinante para Cap-PCV2, mas não induzidas e 3 µL de tampão da amostra. Foram aplicados 6 µL de solução da proteína purificada (1,2 µg de proteína) e 5 µL de tampão de amostra. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C por aproximadamente 5 minutos. O marcador foi aplicado na primeira canaleta e as duas amostras supracitadas foram aplicadas intercaladamente nas outras canaletas do gel.

Após eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi submetida à coloração reversível com Ponceau S (Sigma Chemicals Corporation) por cerca de 10 minutos e, logo em seguida, lavada com água ultra pura. A membrana foi cortada em fitas, com o objetivo de se separar o marcador das amostras, para posterior visualização e demarcação (realizada com caneta) das bandas de proteínas. Além disso, o restante da membrana foi cortada em cinco grupos (cada grupo contendo as duas amostras analisadas), para se testar cinco tipos de diluições do anti-soro bruto do coelho. Em seguida, a membrana (à exceção da fita referente ao marcador) foi bloqueada por duas horas em solução tampão PBS-Tween 0,1% (4,25g de NaCl; 0,08g NaH₂PO₄.2H₂O; 0,64g NaHPO₄; H₂O q.s.p 500 mL, 500 µL de Tween-20, pH 7,6) com leite em pó desnatado 5% (m/v), sob agitação

constante e à temperatura ambiente. A membrana foi, então, lavada com solução de PBS-Tween 0,1% por três vezes (cerca de cinco minutos cada lavagem). Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 15 a 18 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente, em solução de antisoro bruto de coelho contendo o anticorpo primário (Ig-G coelho), nas diluições 1:500, 1:1.000, 1:2000, 1:5.000 e 1:10.000 com o mesmo tampão PBS-Tween 0,1% utilizado para as lavagens. Decorrido o tempo de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi novamente lavada em tampão PBS-Tween 0,1% por três vezes (5 minutos cada lavagem). Em seguida, a membrana foi incubada por 2 horas, sob agitação constante, à temperatura ambiente, na presença de anticorpo secundário (IgG cabra α IgG coelho, conjugado à peroxidase), na diluição de 1:8.000 em solução tampão PBS-Tween 0,1%. Foram repetidas as três lavagens sucessivas de 5 minutos em tampão PBS-Tween 0,1%.

4.13.1. Leitura e interpretação dos resultados

A leitura dos resultados obtidos do gel da corrida eletroforética (corado com Commassie Brilliant Blue) foi feita a olho nu, comparando-se as bandas de proteínas do marcador formadas com as bandas de proteínas das duas amostras utilizadas (proteína Cap-PCV2 previamente purificada e dialisada e o extrato de células de *Escherichia coli* BL-21 transformadas com o gene recombinante para a Cap-PCV2, mas não induzidas).

A leitura dos resultados obtidos das “fitas” da membrana de nitrocelulose (revelação parcial com Ponceau S e revelação final do *blotting* com solução reveladora/peroxidase) foi também feita a olho nu, comparando-se as bandas de proteínas do marcador com as bandas de proteínas das duas amostras utilizadas, analisando-se, além disso, a reatividade de cada titulação testada do soro do coelho.

Para se obter um padrão de interpretação, foram adotados os seguintes parâmetros: o controle negativo (-) foi considerado como sendo o soro do coelho antes das inoculações da proteína recombinante Cap-PCV2 purificada; o controle positivo (+), como sendo o soro do coelho obtido depois da terceira inoculação da proteína recombinante Cap-PCV2.

4.14. Níveis de anticorpos por ELISA

As cinco coletas de soro realizadas em coelho ao qual foi inoculada a proteína purificada foram testadas por ELISA. A 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 de cada uma das soluções preparadas foram utilizados para sensibilizar cada poço, sendo as quantidades de proteína recombinante iguais a 0,01 µg/poço. A placa foi então incubada a 4 °C por 12 horas. Decorrido este período, a placa foi lavada duas vezes com PBS-T (NaCl 0,9 %; Tween 0,05 %; Fosfato 50 mM e pH 7,4) antes que 100 µL do tampão de bloqueio (caseína 2% diluída em PBS-T) fosse adicionado a cada poço. Outras duas lavagens com PBS-T foram feitas e, em seguida, os soros dos animais foram diluídos, 1:100 e então 100 µL adicionados a cada poço. A placa foi novamente lavada por três vezes. O anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase – produzida no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) – BIOAGRO/UFV foi devidamente diluído (1:20.000) e 100 µL foram adicionados a cada poço. Finalmente a placa foi lavada seis vezes com PBS-T e foram adicionados 100 µL da solução que continha o substrato (20 mL de tampão citrato fosfato 100 mM, pH 6,0, 4mg de O.P.D. (0 - fenildiaminobenzeno) e 2,5 µL de H₂O₂ 30 %) em cada poço, sendo a placa incubada por um período de 15 minutos em local escuro. A reação foi parada adicionando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 1:20 e a leitura realizada em leitor de placa a 492 nm.

4.15. Titulação de anticorpos pela técnica de imunocitoquímica

4.15.1 Cepa de PCV2

A cepa de PCV-2 utilizada no presente estudo foi Eu 755379 (GEN bank), N. V. – ES, 3ª passagem. O vírus PCV2 foi inoculado em três garrafas contendo cultivo de células PK15 com 80% de confluência. O tempo de inoculação nas garrafas procedeu-se por uma hora, com realização de movimentos das mesmas com duração de um minuto em intervalos de 15 minutos, objetivando aumentar a adsorção viral. Três garrafas contendo cultivo

de PK15 permaneceram sem a inoculação do vírus para o controle negativo da técnica.

4.15.2 Linhagem celular utilizada e protocolo utilizado para cultivo

Células da linhagem PK15, extraídas de rim de suínos, negativas para PCV-2 pela técnica de “nested-PCR”, foram inicialmente cultivadas em garrafas com área de crescimento de 25 cm², sendo utilizado o meio essencial mínimo, suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos (penicilina e estreptomicina). As garrafas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

4.15.3. Verificação de bandas específicas por Western blotting

Destes mesmos cultivos, foram colhidos agregados de células infectadas com o PCV2 referentes a um frasco de 25 cm² para a técnica de *Western blotting*, aos quais foram adicionados tampão de extração e tampão de lise, seguido de fervura. Vinte microlitros das amostras lisadas foram colocadas, juntamente com 5µl de tampão de corrida 1X, em eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE) para verificação de proteínas expressadas, o qual foi transferido para membrana de nitrocelulose para verificação de bandas específicas do PCV2 (os procedimentos de transferência foram realizados como descrito no item 4.13).

4.15.4. Preparação e fixação da monocamada de células

Após três passagens virais (a cada 48 horas cada uma), as células foram congeladas e descongeladas três vezes para liberação das partículas virais e finalmente estocadas a -70°C. Uma placa de 96 poços foi utilizada para adição de 100µl de cultivo contendo 1,5 x 10⁵ células PK15 livres de PCV2 em cada poço. Esta placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 20 horas de incubação, as células foram inoculadas com PCV2. Uma coluna de poços não sofreu inoculação viral para servir como controle negativo. Após 48 horas de incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, o meio foi removido das placas e descartado em solução de hipoclorito de sódio 3%. Em

seguida, as células foram lavadas com TBS 0,05%, Tween 20 pH 7,6 e fixadas com metanol 100% (100 µL/poço).

4.15.5. Bloqueio da monocamada de células

Para realização do teste, a placa foi primeiramente estabilizada a 37°C. O bloqueio, com intuito de minimizar as reações inespecíficas, foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% em água destilada por 10 minutos. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com TBS 0,05% Tween 20 e foram acrescentados 100 µL por poço de soro normal de coelho 10% e BSA 3%, por 1 hora a 37°C, seguido por tripla lavagem.

4.15.6. Anticorpos primários, secundários e controles negativos

O anticorpo primário utilizado foi coelho anti - Cap PCV2, produzido no laboratório de Infectologia Molecular Animal e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores. Foram testadas diferentes titulações para este anticorpo, a saber: 1:10, 1:50, 1:100 e 1:500. O anticorpo secundário utilizado foi cabra anti IgG de coelho, conjugado com peroxidase, produzido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) – BIOAGRO/UFV e também foi testado em diferentes diluições, a saber: 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000. O anticorpo primário foi testado em duplicata para cada titulação do anticorpo secundário, da mesma forma, o anticorpo secundário foi testado em duplicata para cada titulação do anticorpo primário. Com o objetivo de comparar a efetividade do anticorpo produzido no laboratório, foi testado o anticorpo primário suíno anti-PCV2, adquirido comercialmente (VMRD) na diluição de 1:300. Nos poços onde foi inoculado o anticorpo primário comercial, utilizou-se como anticorpo secundário o conjugado anti IgG de suíno marcado com peroxidase (Sigma, A-5670). Para controle negativo do antígeno, uma coluna de poços foi reservada e, nesta, não foi realizada inoculação viral. Para controle negativo dos anticorpos primários, duas colunas de poços foram reservadas, uma para o anticorpo primário produzido no laboratório e outra para o anticorpo primário comercial. A incubação das células com o anticorpo primário foi realizada durante a noite a 4°C, em câmara úmida, seguido novamente por tripla lavagem com PBS. Após a adição do conjugado, as placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida durante 1 hora.

4.15.7. Revelação e contracoloração

Após a incubação do anticorpo secundário por 1 hora a 37°C a placa sofreu três lavagens com PBS. Seis miligramas de DAB (SIGMA) em 10 mL de tampão Tris pH 7,6 a 0,005M, acrescido de 100µL de uma solução de peróxido de hidrogênio foram utilizados para revelação. Foram adicionados 50µL da solução de DAB em cada poço, incubou-se por 15 minutos em câmara escura e, em seguida, foram realizadas três lavagens com 50µL de PBS. Foram depositados 100µL de hematoxilina de Harris por poço durante 2 minutos, seguido por tripla lavagem em água destilada. Cem microlitros de PBS com formaldeído a 4% foram depositados em cada poço.

4.15.8. Leitura e interpretação

A leitura das placas foi realizada em microscópio óptico de luz invertido. Para interpretação do teste, os resultados sorológicos foram classificados em negativos ou reativos (fortemente positivos: +++, moderadamente positivos: ++ e fracamente positivos: +), de acordo com a diluição.

4.16. Amostras de tecidos suínos para padronização da técnica de imunohistoquímica

Foram utilizados fragmentos de linfonodos de suínos naturalmente infectados, apresentando sinais clínicos compatíveis com a PMWS, (CONTRELL et al., 1999) oriundos de granjas suínolas da região da Zona da Mata de Minas Gerais. Estes animais foram abatidos e amostras de linfonodos mediastínicos, submandibulares, epigástricos, mesentéricos e inguinais superficiais foram colhidas para confirmação da infecção por PCR e exame histopatológico.

Como controle positivo e controle negativo, foram utilizadas amostras de linfonodos oriundos da rotina do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), específicos para tal finalidade.

4.17. Quantificação da carga viral por PCRrt

As amostras colhidas para exame histopatológico foram avaliadas quanto à carga viral em dissertação de mestrado desenvolvida paralelamente no Laboratório de Infectologia Molecular Animal por Silva (2008).

4.18. Processamento histológico

Para a análise histológica dos tecidos, foram utilizadas as amostras fixadas em formol 10% por 48 horas e mantidas em etanol 70%. Cada amostra foi processada segundo a técnica de inclusão em parafina. Para isso, o material fixado foi desidratado com concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e diafanizado em xilol por dois banhos de uma hora cada. Posteriormente, foram realizados dois banhos em parafina líquida a 58°C e, seguido de inclusão em blocos de parafina. Os blocos contendo o material foram seccionados a 4,5 µm com o auxílio de um micrótomo. Para a coloração, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados com concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se Entellan.

4.19. Leitura histopatológica e seleção de amostras para emprego em teste de imunoistoquímica

As alterações histopatológicas foram visualizadas com o auxílio de um microscópio óptico e holografadas em fotomicroscópio Olympus BX-50. Fragmentos microtomizados de órgãos linfóides foram examinadas quanto à depleção linfóide, proliferação de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas e então foram classificadas em sem lesões significativas (SLS) e lesões de estágios 1 (e1), 2 (e2) e 3 (e3) de acordo com a severidade das mesmas, seguindo a metodologia adotada por Chianini et al. (2003). Linfonodos que apresentaram lesões histopatológicas de estágio 2 ou 3 e que apresentaram carga viral média a elevada na técnica de PCRrt foram selecionados para realização dos testes imuistoquímicos.

4.20. Preparação das lâminas de vidro por meio de silanização

Objetivando melhor aderência dos fragmentos microtomizados às lâminas de vidro, estas foram tratadas quimicamente. Tais lâminas foram depositadas em recipiente de vidro e lavadas com solução de Extran® (MA 02 neutro, Merck) 5% em água destilada e pH 7,0. Depois, foram lavadas em água corrente por duas horas, seguido de duas lavagens com água destilada e, posteriormente, com etanol na concentração de 70% por duas vezes e com ácido clorídrico (HCl) 1 N. Novamente, as lâminas foram lavadas por cinco

vezes com água destilada para remoção dos resíduos químicos, seguido de uma lavagem com etanol 95%. As lâminas foram colocadas para secar em estufa a 150°C por 15 minutos. Em uma capela de fluxo laminar, foram depositadas por aproximadamente 20 segundos em uma solução de silano (3-amino-propiltriétoxissilano) a 2% em acetona, à temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 10 segundos cada em acetona P.A. e, imediatamente após, em água destilada por 10 segundos. As lâminas foram secas a 42°C e, então, depositadas em recipiente plástico específico para estocagem de lâminas e armazenadas em temperatura ambiente, na ausência de umidade.

4.21. Padronização da técnica de imunoistoquímica

4.21.1. Preparação das amostras para realização de técnica imunoistoquímica

Os fragmentos selecionados para imunoistoquímica foram microtomizados em micrótomo semi-automático (LEICA RM 2245) em espessura de 3 a 4 µm. Em seguida, foram colocados em estufa a 60°, onde foram mantidos por 60 minutos para desparafinização. Quando o início do protocolo imunoistoquímico não se deu imediatamente após a retirada da estufa, estes fragmentos foram transferidos para estufa a 37°C e ali mantidos até o início do protocolo imunoistoquímico. Após retirada da estufa, os fragmentos foram completamente desparafinizados em xilol, realizando quatro banhos em diferentes cubas, com duração de cinco minutos cada banho.

4.21.2. Reidratação

Os cortes foram retirados do xilol e reidratados em soluções de álcool etílico com concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por cinco minutos em cada concentração. Foi realizado em seguida uma lavagem rápida com água destilada e uma lavagem com TBS 0,05% Tween 20 pH 7,6 por 5 minutos, sucedida por drenagem e secagem das bordas dos cortes histológicos.

4.21.3. Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena

Para recuperação antigênica, foram testados diferentes protocolos, descritos a seguir: 1) Tripsina 1% diluída em TBS; 2) Tampão citrato associado a aquecimento em microondas e 3) Proteinase K 0,5%. Aproximadamente 150µl da solução (quantidade suficiente para cobrir os tecidos) foram depositados em cima de cada fragmento aderido à lâmina, a qual foi colocada para incubação em câmara úmida por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em solução TBS 0,05% Tween 20 e novamente foi realizada a drenagem e secagem das bordas dos cortes histológicos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com gotejamento de 150µL de solução de peróxido de hidrogênio 3%, diluído em solução TBS 0,05%, Tween 20, seguido novamente por lavagem durante cinco minutos e secagem das lâminas.

4.21.4. Bloqueio contra ligações inespecíficas

O bloqueio contra ligações inespecíficas foi realizado testando-se diferentes metodologias, citadas a seguir: 1) soro fetal bovino 3% em TBS 0,5% em Tween 20; 2) leite em pó desnatado 5% em TBS 0,5% em Tween 20 e 3) soro de cabra clinicamente saudável (soro da mesma espécie em que foi produzido o anticorpo secundário) diluído a 3% em solução TBS 0,05% Tween 20. Foram depositados em cima de cada fragmento, 150µL de solução e a lâmina foi incubada em câmara úmida por aproximadamente uma hora e meia (01h:30min). Em seguida, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos cada, com TBS 0,05% Tween 20 (ou PBS), seguido por drenagem e secagem.

As drenagens foram realizadas vertendo suavemente o líquido de cima das lâminas e foram feitas secagens com papel toalha na parte inferior da lâmina e ao redor do corte, ficando úmido apenas em cima do corte. Teve-se muito cuidado para que não ocorresse remoção dos fragmentos nem formação de dobras nos mesmos.

4.21.5. Anticorpo primário

Foi utilizado o anticorpo policlonal produzido em coelho a partir da proteína recombinante, do capsídeo do PCV2, denominada ORF2, seguindo metodologia já descrita nos itens 4.6, 4.7 e 4.8. O anticorpo anti – Cap PCV2 foi testado nas seguintes titulações: 1:10, 1:20 e 1:50. Cada titulação foi testada em duplicata e foi realizado um controle negativo para cada amostra. Este controle negativo consistiu da substituição do anticorpo primário por TBS 0,05% Tween 20. Em cima de cada fragmento foi depositado um volume de aproximadamente 150µL de solução. A incubação foi realizada *overnight* a 4°C, em câmara úmida.

4.21.6. Lavagens

Foram realizadas duas lavagens de cinco minutos cada com TBS 0,05% Tween 20, seguido por drenagem e secagem. Os mesmos procedimentos de lavagens e secagens foram realizados como descrito no item 4.26.3.

4.21.7. Anticorpo secundário

Foi utilizado anticorpo cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase, produzido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) – BIOAGRO/UFV, seguindo diluição recomendada (1:200). Sobre cada fragmento foi depositado um volume de aproximadamente 150µL de solução. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante uma hora e meia.

4.21.8. Lavagem

Após a incubação, os tecidos foram lavados novamente por duas vezes de cinco minutos em TBS 0,05%, Tween 20, seguido por drenagem e secagem. Os mesmos procedimentos de lavagem e secagem foram realizados como descrito no item 4.26.3.

4.21.9. Revelação

A revelação foi realizada utilizando-se de solução tetra-hidroclorato de 3,5-diamino-benzidina (DAB) (Vector, Peroxidase Substrat Kit DAB). A solução foi preparada imediatamente antes do uso de acordo com recomendação do

fabricante, em 5,0 ml de água destilada. Quantidade suficiente da solução foi adicionada sobre as lâminas para cobrir os tecidos e a reação foi monitorada em microscópico ótico. Quando atingido o tempo ideal, a revelação foi parada lavando os cortes em água destilada por cinco minutos.

4.21.10. Contracoloração, desidratação e montagem das lâminas

Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto e novamente lavados em água destilada durante 5 minutos. Efetuou-se a desidratação dos fragmentos nas lâminas utilizando-se concentrações crescentes de álcool etílico (80%, 90% e 100%), com banhos de aproximadamente três minutos cada. Em seguida, as lâminas foram colocadas em xilol e montadas com lamínulas e entellan para posterior visualização microscópica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clivagem e purificação de DNA plasmidial

A eletroforese em gel de agarose 1% mostrou que os procedimentos de clivagem e purificação de DNA plasmidial ocorreram com êxito. O DNA plasmidial contendo a sequência codificadora do capsídeo viral foi submetido à reação de clivagem com a enzima de restrição *EcoRI*, originando um fragmento de 472 pb. Os tamanhos dos fragmentos obtidos possuem padrão esperados (Figura 02).

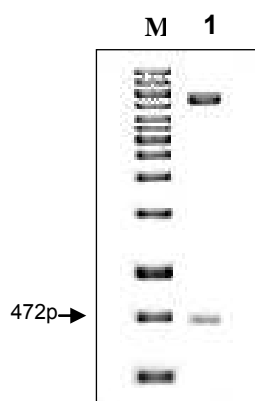


Figura 02: Eletroforese em gel de agarose da clivagem e purificação do DNA plasmidial. **M:** Marcador DNA ladder 100 pb; **1:** Bandas de DNA clivado, mostrando o DNA plasmidial (banda superior) e DNA viral, fragmento de 472pb.

5.3. Purificação da proteína pela cromatografia de afinidade

No presente trabalho a indução com 0,25 mM de IPTG, o tampão de equilíbrio III e a cromatografia de afinidade de níquel foram variáveis que apresentaram melhores resultados, quando comparados à purificação utilizando 0,1mM de IPTG ou os tampões de equilíbrio II e III. A pureza da proteína pôde ser avaliada como satisfatória pela técnica SDS-PAGE (Figura 3). Os valores encontrados mostraram que 7,15 mg da proteína recombinante podem ser obtidas a partir de 1 litro de meio induzido. Estes resultados mostram que a proteína Cap pode ser purificada em quantidade satisfatória

para ser usada como antígeno em diversas ferramentas diagnósticas. Dados semelhantes de purificação da Cap recombinante foram obtidos por Silva (2008), que utilizou o mesmo sistema bacteriano, porém, outras metodologias de indução e purificação.

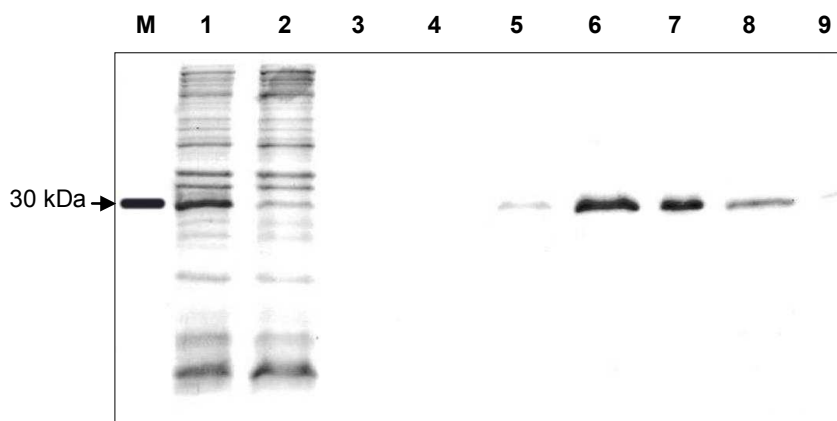


Figura 03: Eletroforese em gel de poliácridamida da purificação da proteína na indução com 0,25 mM de IPTG, ressuspensão com o tampão de equilíbrio III. **M:** marcador de peso molecular; **1:** lavagem com tampão de equilíbrio III dos corpos de inclusão; **2:** volume não ligado; **3:** lavagem com 20 mM de imidazol; **4:** lavagem com 60 mM de imidazol; **5-7:** eluição com 120 mM de imidazol; e **8-9:** eluição com 250 mM de imidazol.

A tentativa de purificação da proteína recombinante dos corpos de inclusão de células induzidas com 0,1 mM de IPTG mostrou que a proteína não se ligava ou se ligava com baixa afinidade à resina. Isso possivelmente ocorreu devido à presença de uma grande quantidade de proteínas interferentes que poderiam dificultar a ligação da proteína recombinante à resina, uma vez que a quantidade daquelas em relação à proteína de interesse era muito maior na indução de 0,1 mM de IPTG (figura 04). Esse problema de baixa afinidade de ligação também foi identificado quando o tampão de equilíbrio II era utilizado.

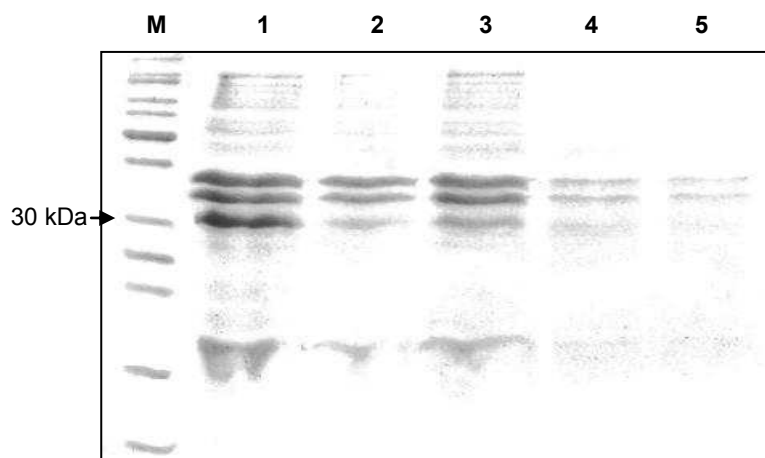


Figura 04: Eletroforese em gel de poliacrilamida da purificação da proteína na indução com 0,1 mM de IPTG, ressuspensão com o tampão de equilíbrio II. **M:** marcador de peso molecular; **1:** lavagem com tampão de equilíbrio II dos corpos de inclusão; **2:** volume não ligado; **3:** lavagem com 10 mM de imidazol; **4:** lavagem com 20 mM de imidazol; **5:** eluição com 120 mM de imidazol;

Embora Liu et al. (2006) tenham conseguido expressar a sequência completa da ORF2 fusionada a cauda de Histidina em *E. coli* (XL1-Blue MRF), a baixa recuperação da proteína inviabilizou o seu uso para o desenvolvimento de um ELISA Indireto. Diversos pesquisadores retiraram o sinal de localização nuclear da região amino terminal, uma vez que não há indícios que essa região seja imunogênica, visando um aumento na indução e, por conseguinte, na recuperação da proteína após a purificação (ZHOU et al., 2005).

5.4. *Western blotting*

A expressão da proteína do capsídeo do PCV2 foi confirmada por *Western blotting* usando um soro policlonal comercial anti-PCV2 (VMRD, Inc.) e um soro anti-cauda de Histidina (Figuras 5 - A e 5 - B, respectivamente). Análise do resultado do *Western blotting* confirmou a banda de aproximadamente 30 kDa, correspondente à proteína codificada pela ORF2, adicionada de cauda de histidina.

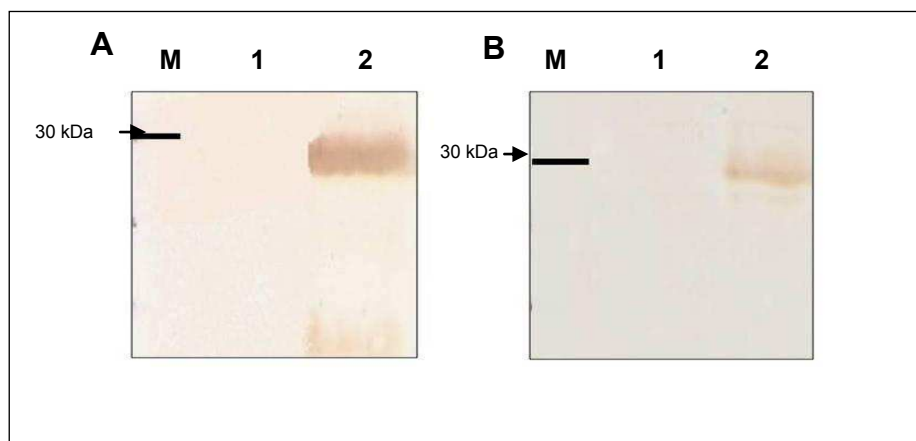


Figura 05: *Western blotting* da proteína recombinante purificada. M: Marcador; 1: Células não transformadas (controle negativo); 2: proteína do capsídeo recombinante purificada. (A) Soro de suíno anti-PCV 1:8000 e anticorpo IgG de coelho anti-IgG de suíno conjugado a peroxidase 1:16000. (B) Soro de camundongo anti-Histidina 1:3000 e anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase 1:2000.

5.5. Diálise da proteína expressa

Após a purificação, a proteína foi submetida à diálise para a remoção da uréia. A membrana de diálise possuía poros entre 12 e 16 kDa, evitando que a proteína ultrapassasse, permitindo apenas a troca de solutos e solventes. Após a diálise, observou-se que a proteína permaneceu praticamente na mesma concentração anterior à diálise, atingindo uma recuperação de 92 %, após a dosagem da concentração final de proteína por Bradford.

Entretanto, observou-se que a qualidade da diálise e, conseqüentemente, do produto final dialisado, dependem diretamente da metodologia empregada. O tipo de tampão, volume do tampão utilizado e o número de trocas de tampão são passos importantes para que a proteína Cap PCV2 mantenha sua estrutura conformacional adequada para indução de uma resposta imune eficaz nos coelhos. Verificou-se que coelhos imunizados com a proteína não dialisada ou pouco dialisada não produziram anticorpos de boa afinidade para serem utilizados em imunistoquímica. Quando o protocolo de inoculações em coelhos foi realizado com a proteína Cap purificada e dialisada com oito trocas de tampão, os resultados obtidos na técnica imunistoquímica foram satisfatórios. De fato, Abbas e Lichtman (2005) consideram que alguns epítomos podem não ser apresentados corretamente ao sistema imune quando a proteína não estiver em sua forma nativa e isso resultará numa resposta ineficiente ao antígeno em questão. O grande período de tempo em que a

proteína ficou submetida à diálise parece não interferir na qualidade e na concentração final desta proteína, sobretudo, porque esta diálise foi realizada sempre à temperatura de 4 °C. Salgado (2008) mostrou que para curtos intervalos de tempo (≤ 22 dias) a forma mais fácil, barata e eficaz de se armazenar a proteína é a 4 °C sem a adição de quaisquer agentes estabilizantes e sem que haja desnaturação significativa desta proteína.

Entretanto, a proteína purificada foi estocada, preferencialmente, a 80 °C negativos (-80 °C) adicionado de 25% glicerol, seguindo recomendações de Salgado (2008). Apesar desta forma de congelamento implicar em uma pequena perda após descongelamento e envolver maior tempo de manipulação da amostra, mostrou-se a forma mais eficaz de estocagem da proteína Cap PCV2. Isto se deve ao fato de que, após a purificação, a proteína pode ficar armazenada por um período de tempo mais longo, se riscos de contaminação. Quando a proteína ficou armazenada por longo período a 4 °C foi verificado que houve contaminação da amostra por microrganismos e perda acentuada da concentração da proteína, provavelmente, por desnaturação.

5.6. Verificação da especificidade de ligação e da titulação de anticorpos por meio de *western blotting*

Os resultados do *immunoblotting* com o soro pré-imune (Figura 06) revelaram resultado negativo (na banda de 30kDa), tanto para a proteína recombinante Cap-PCV2 (purificada e previamente dializada), quanto para os lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformados com o gene recombinante para a proteína do capsídeo do PCV2 não induzido. Além disso, os resultados do *immunoblotting* com o soro pré-imune foram negativos, na banda de 30 kDa, em todas as diluições testadas (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 e 1:10000) para ambas amostras. Entretanto, para outras bandas acima de 30 kDa, verificou-se marcação inespecífica (para os lisados celulares de BL-21 transformados com o gene recombinante Cap-PCV2 não induzidos) em diluições menores que 1:2000. Somente a diluição de 1:10000 para os lisados celulares de BL-21 (transformadas, mas não induzidas) não foi testada experimentalmente. Provavelmente esses resultados também seriam negativos, uma vez que todas as diluições maiores do anticorpo primário apresentaram resultados negativos.

Estes resultados demonstram que os coelhos não possuíam anticorpos que se ligavam à proteína Cap PCV2 antes das inoculações.

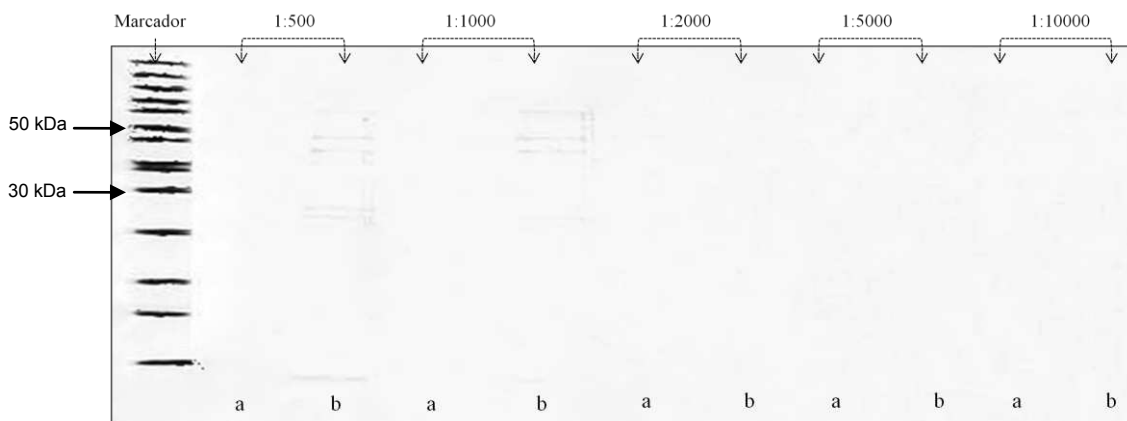


Figura 06 – *Western blotting* com soro de coelho pré-imune, nas diluições: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10.000. Marcador de peso molecular de 200-10 kD; **a)** Proteína recombinante purificada Cap-PCV2; **b)** Lisados celulares de BL-21 transformados com o gene da proteína recombinante Cap-PCV2, mas não induzidos.

Os resultados do *immunoblotting* utilizando-se os soros pós-inoculações da proteína recombinante Cap-PCV2 (Figura 7) revelam resultado positivo, na banda de 30 kDa, para a proteína recombinante Cap-PCV2 (purificada e previamente dializada), em todas as diluições utilizadas (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000). Para os lisados celulares de BL-21 transformados com o gene recombinante para a proteína do capsídeo do PCV2, mas não induzidos, o resultado fracamente positivo para diluições menores/iguais a 1:5000. A reatividade do “immunoblotting” para esses lisados celulares foi menor do que a da proteína Cap-PCV2 purificada porque a quantidade da proteína recombinante Cap-PCV2 presente nessas células transformadas é menor e não está purificada, portanto, em menor concentração.

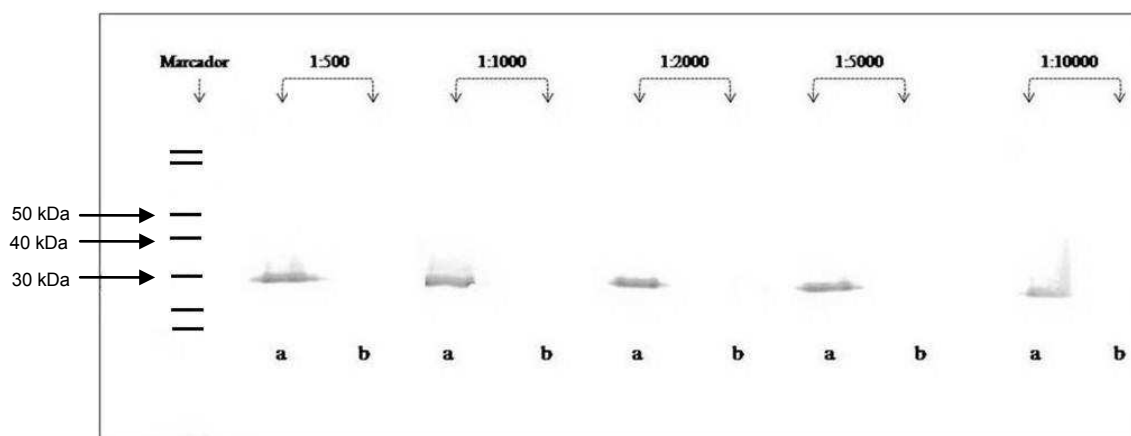


Figura 07: *Western blotting* com soro hiperimune de coelho anti-Cap-PCV2. Diluições testadas: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 e 1:10.000. Marcador de peso molecular de 200-10 kD; **a)** Proteína recombinante purificada Cap-PCV2, e em **b)** Lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformados com o gene da proteína recombinante Cap-PCV2, mas não induzidos.

Estes resultados demonstram que os coelhos produziram anticorpos contra a proteína do capsídeo viral, condizente com as inoculações experimentais da proteína recombinante Cap-PCV2 purificada. A eficácia na produção de soro hiperimune anti-PCV2 pode ser verificada ao se comparar os resultados obtidos do *immunoblotting* nas membranas de nitrocelulose utilizando-se o soro pré-imune e o soro hiperimune.

As diluições utilizadas na técnica de *Western blotting* para os soros do coelho (pré-imune e hiperimune), se mostraram satisfatórias, todavia, principalmente para a amostra de proteína recombinante purificada de Cap-PCV2, seria possível realizar mais testes para se analisar a reatividade em diluições sorológicas maiores que 1:10000 – uma vez que até mesmo nessa diluição verificou-se boa reatividade no *immunoblotting* – o que diminuiria ainda mais reações inespecíficas e, ou, reações cruzadas. Poderia se testar também o anticorpo secundário em concentrações menores, ou seja, diluições maiores que a de 1:8000. Estes resultados denotam boa afinidade de ligação do anticorpo produzido à proteína recombinante Cap PCV2.

As bandas protéicas inespecíficas verificadas na revelação final do *immunoblotting* para os lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformada, são explicadas pela não-pureza da amostra analisada, e, ou, degradação protéica. Por se tratar de um lisado celular, várias outras proteínas além da Cap-PCV2

estão presentes na amostra. Como o soro do coelho é um soro hiperimune anti-PCV2, ou seja, policlonal, então pode apresentar vários anticorpos contra várias outras proteínas ou antígenos de diversos patógenos que já entraram em contato com o coelho durante sua vida.

5.7. ELISA Indireto

A proteína purificada e dialisada foi usada na técnica de ELISA indireto (Figura 08). A quantidade de proteína de 0,01µg de proteína por poço foi capaz de gerar picos próximos a 1,2 de absorbância. A figura 08 apresenta os valores de absorbância obtidos, os quais são resultantes da capacidade de ligação entre antígenos e anticorpos. A titulação estabelecida foi de 1:100 para os diversos soros coletados (desde o pré imune ao soro obtido 15 dias após a quarta inoculação do animal (coleta 5). A curva observada demonstra o crescimento gradual do título de anticorpos anti – Cap PCV2 presentes no soro do coelho após cada inoculação.

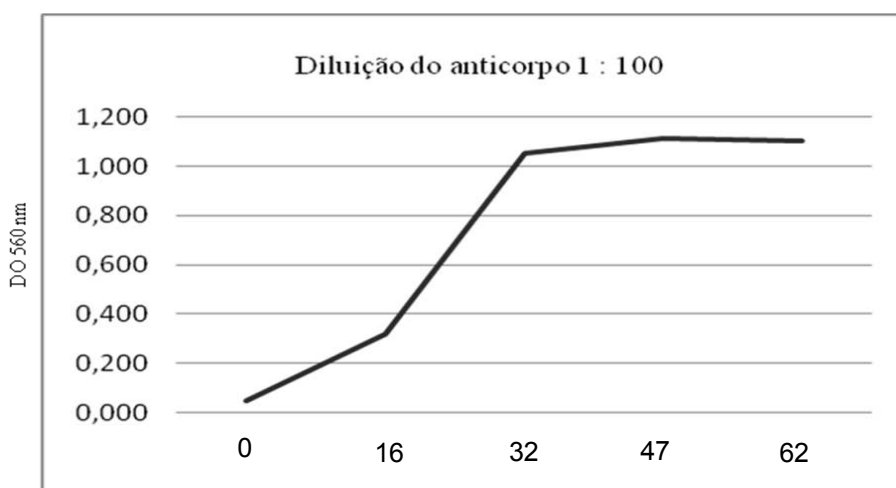


Figura 08: ELISA Indireto utilizando a Cap – PCV2 recombinante purificada e dialisada como antígeno. Quantidade de 0,01 µg de proteína foi usada para sensibilizar cada poço. Os números 0, 16, 32, 47 e 62 correspondem ao dia de cada coleta de soro, onde 0 corresponde ao soro pré-imune e 62 corresponde ao soro hiperimune.

Recentemente, diversos métodos têm sido desenvolvidos na tentativa de gerar um método confiável e aplicável em larga escala na análise para produção de antígenos recombinantes dos PCV2 como antígeno em ensaios de diagnóstico. Estes se baseiam na expressão da proteína Cap recombinante

utilizando o baculovirus como vetor (LIU et al., 2007; NAWAGITGUL et al., 2000). Diversos trabalhos utilizam sistema de expressão da proteína recombinante do capsídeo do PCV2 em *E. coli* e têm obtido bons resultados em investigações sorológicas (WU et al., 2008; SHANG et al., 2009).

5.8. Confirmação da presença do vírus nos cultivos celulares e comparação com os controles negativos

A técnica de *Western blotting* para verificação da presença viral nos meios de cultivo (Figura 09) apresentou resultados satisfatórios. A observação de marcações em bandas de peso molecular de aproximadamente 30 e 28 KDa tanto no controle positivo (canaleta 1), quanto nos cultivos celulares de PK15 (canaleta 4) confirmam a presença do antígeno. A ausência de marcações nos controles negativos (células PK15 infectadas com PCV1) demonstra que não houve reação sorológica cruzada com o anticorpo policlonal produzido.

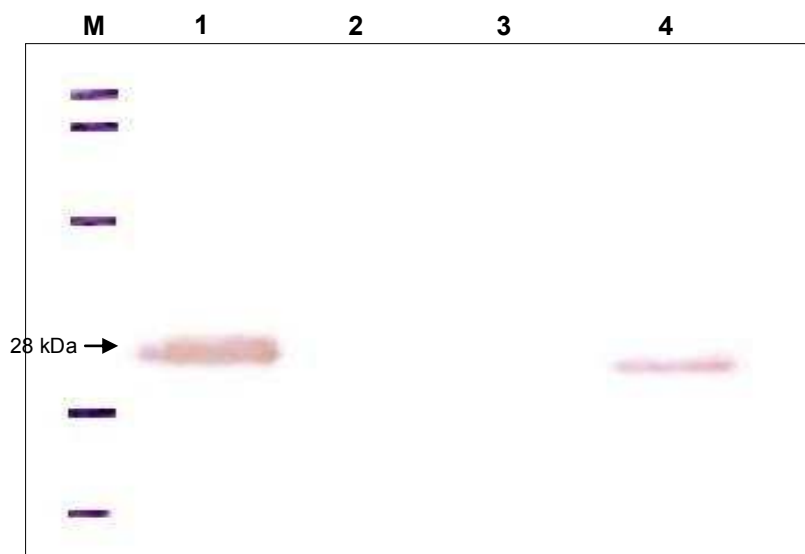


Figura 9: *Western blotting* de lisados celulares. **M:** marcador de peso molecular PageRuler; **1:** Controle positivo (proteína recombinante purificada); **2 e 3:** Controles negativos (lisados de cultivos de células PK15 infectadas com PCV1); **4:** lisado de cultivo de células PK15 infectadas com o PCV2.

Além da confirmação da presença viral nos cultivos celulares, o teste demonstrou também a afinidade de ligação do anticorpo anti-CapPCV2 tanto na proteína recombinante purificada quanto em proteínas estruturais do vírus. Estes resultados já apontam a possibilidade de aplicação do anticorpo produzido em cultivos celulares e em cortes histológicos de tecidos.

5.9. Padronização de técnica de imunocitoquímica

A figura 10 apresenta o esquema de diferentes titulações de anticorpos primários e secundários utilizadas na tentativa de estabelecer uma titulação ideal, sobretudo, para o anticorpo primário e, assim, aplicá-la aos cortes histológicos de suínos naturalmente infectados.

	1:10	1:50	1:100	1:500	PCV2 negativo	Ac prim. negativo	Ac sec. negativo	1:300	1:300	1:300		
1:100	+++	+++	++	++	○	+	○	-	-	+++	+++	+++
1:100	+++	+++	++	++	○	+	○	-	-	+++	+++	+++
1:250	+++	+++	++	+	○	+	○	-	-	+++	+++	+++
1:250	+++	+++	++	+	○	+	○	-	-	+++	+++	+++
1:500	+++	+++	++	+	○	-?	○	-	-	+++	+++	+++
1:500	+++	+++	++	+	○	-?	○	-	-	+++	+++	+++
1:1000	++	++	+	-	○	-	○	-	-	+++	+++	+++
1:1000	++	++	+	-	○	-	○	-	-	+++	+++	+++

Figura 10: Esquema das diferentes titulações testadas na imunocitoquímica para o anticorpo primário e secundário. **+++**: fortemente positivos; **++**: moderadamente positivos; **+**: fracamente positivos; **-?**: inconclusivos; **-**: negativos; **PCV2 negativo**: Cultivos de células PK15 negativos para PCV2; **Ac prim. negativo**: As amostras não foram incubadas com anticorpo primário; **Ac sec. negativo**: As amostras não foram incubadas com anticorpo secundário.

Observou-se, no entanto, que titulações muito baixas do anticorpo primário (1:10) apresentavam marcações fortes nos cultivos infectados com PCV2 (fortemente positivos, +++), mas os resultados não se mostraram tão confiáveis devido à intensa marcação inespecífica observada, principalmente quando essa titulação estava associada com diluições muito baixas de anticorpo secundário (1:100 e 1:250) (Figura 11 – A). A titulação de 1:50 do anticorpo primário (Figura 11 – B) mostrou boas marcações quando a titulação do anticorpo secundário foi mais elevada (1:1000), mas quando esta última foi usada em baixas titulações, as marcações inespecíficas se fizeram presentes. As titulações de 1:100 (Figura 11 – C) e 1:500 para o anticorpo primário não apresentaram marcações satisfatórias. A Figura 11 – D ilustra o controle negativo para o anticorpo primário, onde se utilizou TBS no lugar do anticorpo, e a Figura 11 – E demonstra o controle negativo do antígeno, ou seja, não foi realizada inoculação do PCV2 nesse tratamento.

Para controle da técnica imunocitoquímica empregada e comparação da eficácia do anticorpo produzido frente à do anticorpo comercial, três colunas de poços foram incubadas com o anticorpo primário comercial IgG de suíno anti-PCV2 (VMRD) na titulação de 1:300; nesse caso, o anticorpo secundário utilizado foi o conjugado com peroxidase anti-IgG de suíno (Figura 11 – F). Resultados positivos também foram obtidos nesta amostra, entretanto, observou-se que a intensidade de reações inespecíficas foi inferior à presente no anticorpo anti-Cap PCV2.

Nas duas formas de controle negativo (controle do anticorpo e do antígeno) foram observadas marcações tênues, as quais se confundem com reações inespecíficas, e no controle negativo para o antígeno pode-se verificar uma maior integridade das células, o contrário do observado em todos os outros tratamentos, onde a lise celular esteve sempre presente. Essa falta de integridade nas células cultivadas pode ser devido à recuperação antigênica e ao bloqueio da peroxidase endógena, realizado com peróxido de hidrogênio a 3%. Outro fator importante a ser considerado é o fato de que o PCV2 pode causar injúrias nas células hospedeiras. Essa última hipótese é mais plausível, pois os controles negativos para o antígeno, ou seja, naqueles poços onde não

foi inoculado o PCV2, a injúria celular era bem menos significativa. De fato, Liu et al. (2006) mostraram que a ORF3 do PCV2 tem a capacidade de induzir células à apoptose, tanto em cultivo celular quanto em tecidos animais, tornando-as mais susceptíveis.

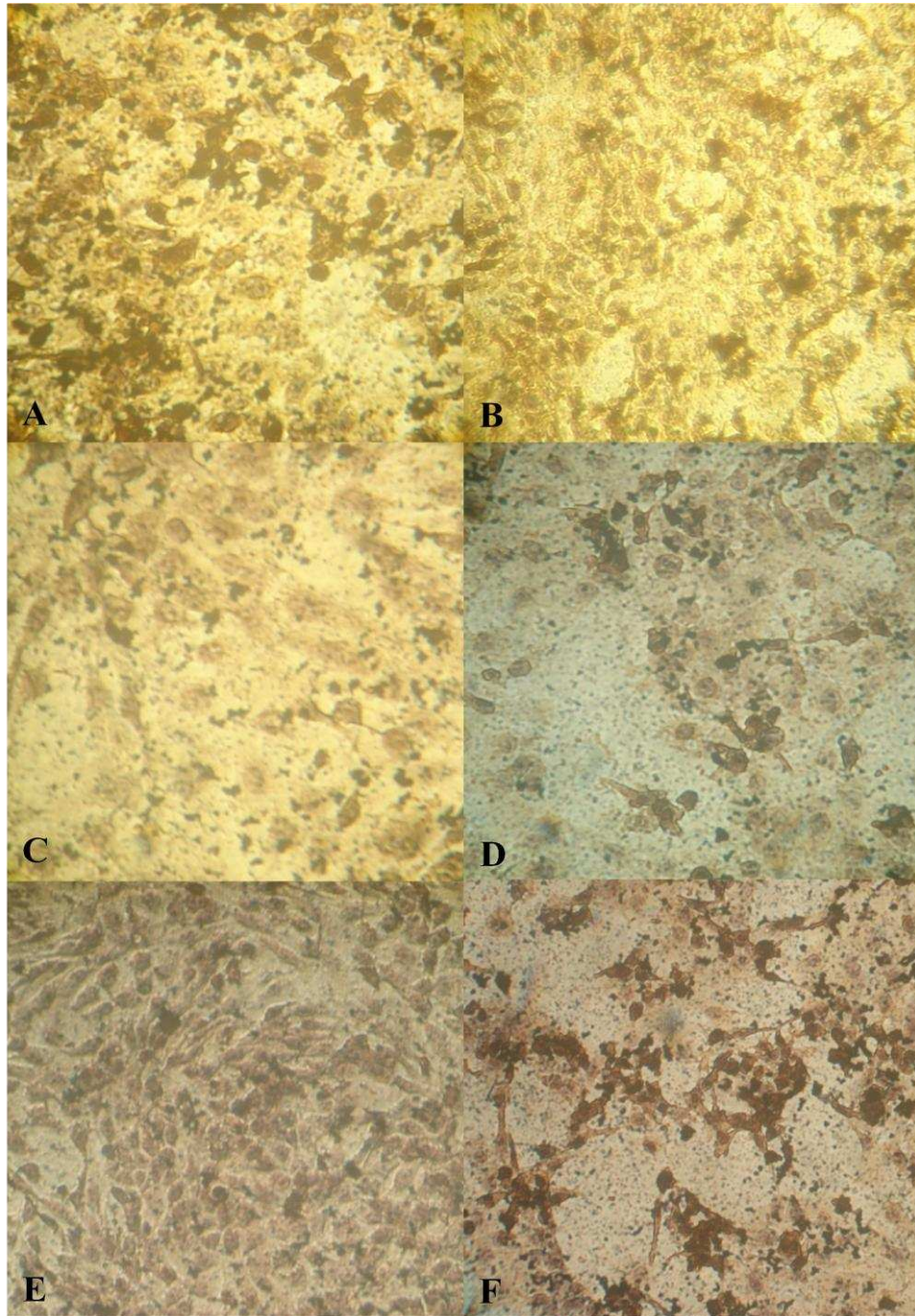


Figura 11: Técnica de imunocitoquímica em placas de 96 poços. **A:** Titulação de anticorpo primário de 1:10, reação fortemente positiva (+++); **B:** Titulação de anticorpo primário de 1:50, reação positiva moderada (++); **C:** Titulação do anticorpo primário de 1:100, reação positiva fraca (+); **D:** Controle negativo para o anticorpo primário; **E:** Controle negativo para o antígeno; **F:** Teste com anticorpo primário comercial na titulação de 1:300.

5.10. Imunoistoquímica

A tabela 02 apresenta os fragmentos de linfonodos que foram avaliados para imunoistoquímica. Resultados satisfatórios foram obtidos utilizando o anticorpo primário produzido a partir da proteína recombinante Cap PCV2, entretanto, o maior percentual de amostras positivas foi obtido quando o anticorpo foi usado da titulação 1:10 (aproximadamente 75 % de positividade), seguido da titulação 1:20 (aproximadamente 58 %). Todavia, na titulação de 1:10 as marcações inespecíficas foram acentuadas devido excesso de anticorpo usado na amostra para se conseguir positividade. Na titulação de 1:50 as reações inespecíficas são discretas, porém, as marcações imunoistoquímicas são tênues ou ausentes, portanto, esta titulação não apresentou resultado satisfatório (aproximadamente 25 % de positividade). Estas titulações são consideradas insatisfatórias quando comparada à titulação recomendada pela maioria dos fabricantes de anticorpos comerciais. Gava (2006) obteve bons resultados utilizando a titulação de 1:200 para o anticorpo primário comercial.

Tabela 01: Resultado do teste imunoistoquímico e da carga viral pela PCRrt.

Amostra	Estágio de lesão (histopatologia)	Carga viral (log10)	Titulação 1:10	Titulação 1:20	Titulação 1:50	Controle negativo	Ac. comerc.
Mediast. 1	E 3	7.00	+ *	+*	-	-*	+
Mesent. 1	E 3	7.48	-*	-	-	-	-
Mediast. 2	E 3	7.38	+*	+	+	-	+
Inguinal 1	E 2	4.29	- *	-	-	-	+
Inguinal 2	E 2	5.41	-	-	-	-	-
Mesent. 2	E 2	6.01	+*	+*	+	-	+
Mediast. 3	E 3	7.58	+*	+	-	-	+
Mediast. 4	E 2	5.80	+*	+*	-	-	+
Inguinal 3	E 3	6.91	+	-	-	-	+
Inguinal 4	E 2	5.02	+*	+*	-	-	+
Epigást. 1	E 2	5.87	+	-	-	-	+
Controle +	E 3	ND	+*	+*	+*	-*	+
Controle -	SLS	ND	-*	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo; *: presença de marcações inespecíficas; ND: não determinado; E: estágio de lesão; SLS: sem lesões significativas

Algumas amostras analisadas não apresentaram marcações específicas para o PCV2, apesar das mesmas apresentarem elevados valores de carga viral pela técnica de PCR em tempo real (PCRtr) e lesões histopatológicas específicas para o PCV2. Algumas vezes, as reações observadas foram tênues, não permitindo, dessa forma, resultados de positividade confiáveis. Verificou-se também, alto índice de marcações inespecíficas em algumas amostras, sobretudo, quando o anticorpo primário foi utilizado em maior concentração ou quando o tempo de incubação com enzimas proteolíticas foi duradouro. De fato, McNeilly et al. (1999) afirmam que um maior tempo de incubação com enzimas proteolíticas pode aumentar a intensidade de sinais de fundo inespecíficos. Entretanto, os diferentes métodos testados de bloqueio de ligações inespecíficas (soro, caseína ou leite em pó), assim como os diferentes métodos testados para recuperação antigênica (proteinase K e tripsina) pareceram não ter efeito sobre as marcações inespecíficas, já que em todos os diferentes tratamentos tais marcações foram observadas. O fato das marcações inespecíficas terem sido observadas principalmente na titulação de 1:10, denota que estas reações podem estar relacionadas a um grau de saturação do anticorpo primário, entretanto, este fator não pode ser considerado isoladamente, pois, mesmo em alguns controles negativos para anticorpo primário (onde este foi substituído por TBS), foi verificado algum grau de reação inespecífica.

Foi observado no presente estudo que períodos longos de exposição às enzimas proteolíticas danificam, principalmente, o citoplasma celular, ocasionando muitas vezes em perda citoplasmática ou alteração na morfologia celular. Entretanto, de acordo com Morgan et al. (1997), a recuperação antigênica atua benéficamente de várias formas sob os tecidos, incluindo a quebra de ligações cruzadas, extração de proteínas bloqueadores difusíveis, precipitação de proteínas, hidrólises, quelação de cálcio, remoção de parafina e reidratação do tecido, resultando em melhor penetração do anticorpo e acessibilidade aumentada ao antígeno. Ramos-Vara et al. (2000) afirmam que longos períodos de fixação podem diminuir a imunorreatividade e requerer métodos de recuperação antigênica mais eficazes, concentrações maiores de anticorpos e, finalmente, um período de incubação mais longo para se encontrar um grau similar de imunorreatividade e um menor grau de marcações

inespecíficas. Arnold et al. (1996) citam que um tempo prolongado de fixação com formalina produz pontes de metileno entre grupos de aminoácidos livres e outros grupos funcionais de proteínas, resultando em alterações conformacionais na estrutura terciária e quaternária de proteínas e ligações cruzadas entre proteínas teciduais, modificando os epítomos reconhecidos pelos anticorpos.

O tempo ideal de revelação, utilizando o substrato de revelação DAB associado ao peróxido de hidrogênio foi de oito minutos. Exposição à solução reveladora por tempos maiores que este se mostrou responsável por intensa formação de reações inespecíficas. Este tempo foi superior ao padronizado por Gava (2006), onde o tempo ideal de revelação, utilizando a mesma substância reveladora na mesma concentração foi de cinco minutos. Porém, este autor não cita a adição de peróxido de hidrogênio ao substrato.

Ramos-Vara et al. (2008) conceituam que o principal objetivo da padronização em imunistoquímica é obter resultados reproduzíveis e consistentes dentro de cada laboratório e resultados comparáveis entre diferentes laboratórios, mesmo utilizando diferentes procedimentos. Não obstante, segundo Ramos-Vara et al. (2005), a padronização de um novo teste de imunistoquímica é determinada pela otimização de condições para permitir que o anticorpo selecionado reaja com o antígeno expressado. Dentre essas condições, o tempo de incubação, a temperatura de incubação, as diluições, os controles e as soluções preparadas são parâmetros fundamentais de serem padronizados.

A indução da produção de anticorpos anti – Cap PCV2 pelo coelho, com afinidade de ligação a esta proteína, foi realizada por meio de inoculação da mesma no animal, a qual foi previamente expressada, purificada e dialisada em laboratório, como descrito anteriormente. Verificou-se, no entanto, que um dos passos de grande importância para a produção de um soro hiperimune de boa afinidade para aplicação em técnica imunistoquímica é a diálise. Inoculações da proteína não dialisada ou pouco dialisada em coelho resultou na produção de um soro de baixa afinidade de ligação. O mesmo protocolo de inoculação, utilizando a proteína Cap – PCV2 eficientemente dialisada apresentou resultados superiores quando este soro foi aplicado na técnica imunistoquímica. Para obtenção de quantidades significativas de proteína por

meio da cromatografia de afinidade, torna-se necessária adição de tampões às soluções. A grande quantidade de sais presentes nestes tampões pode alterar a estrutura conformacional da proteína (NELSON e COX, 2004), o que poderá resultar em uma apresentação de antígeno comprometida quando esta proteína é inoculada no animal. Alguns epítomos podem não ser apresentados corretamente ao sistema imune e isso resultará numa resposta ineficiente ao antígeno em questão (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Marcações imunoistoquímicas de antígenos do PCV2 foram verificadas em células do sistema mononuclear fagocítico, células gigantes e em linfócitos (figura 12 – A, B, C, D; figura 13 – A).

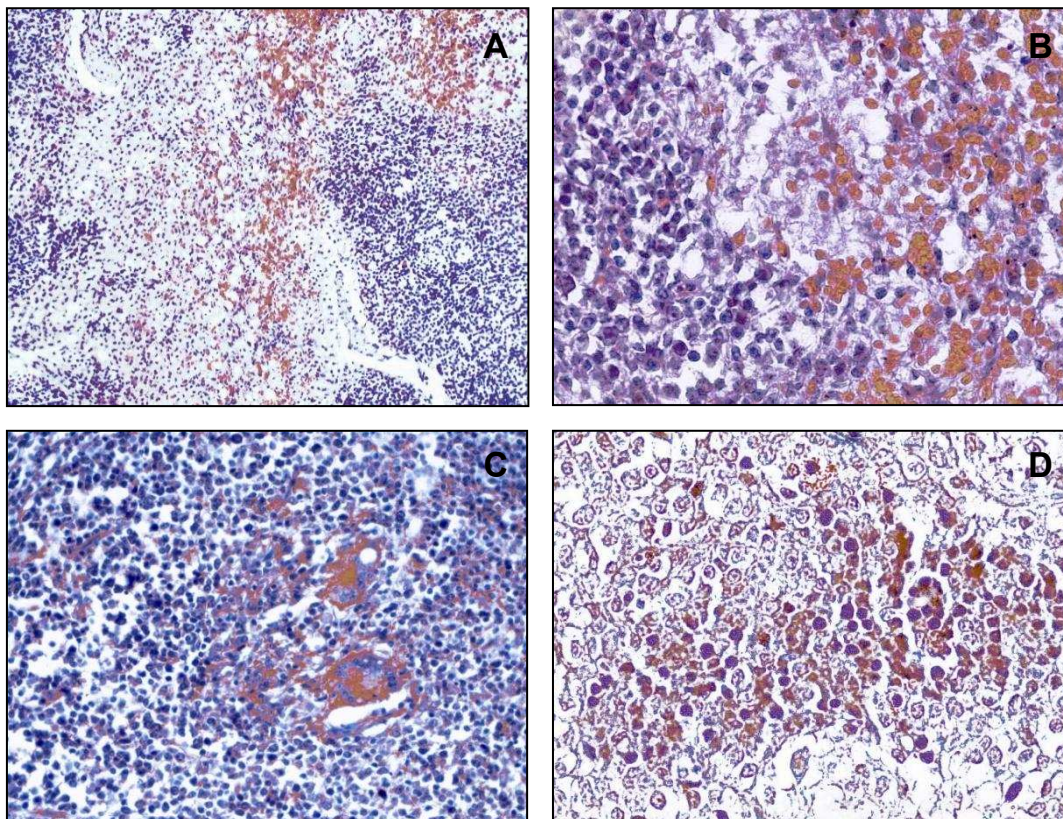


Figura 12: Testes imunoistoquímicos. **A:** Linfonodo mediastínico, marcação difusa em área interfolicular, título 1:20 (100x); **B:** Linfonodo mesentérico, marcações bem evidenciadas ao redor de linfócitos e células mononucleares fagocíticas, título 1:20 (400x); **C:** Linfonodo mesentérico, marcações em células gigantes e marcações inespecíficas, título 1:10 (200x); **D:** Linfonodo mesentérico, título 1:20, áreas de marcações difusas (400x). Contracoloração: hematoxilina de Harris, DAB.

As marcações foram observadas principalmente no interior de folículos linfóides. Entretanto, marcações importantes também foram encontradas em áreas interfoliculares (figura 12 – A), principalmente nas regiões do córtex interno em que há edema e apoptose de linfócitos mais pronunciados. Krakowka et al. (2005), verificaram que o vírus está preferencialmente distribuído nos histiócitos, monócitos, macrófagos, células gigantes e outros tipos celulares, que podem estar distribuídos difusamente nos tecidos linfóides infectados. Na figura 12 – C são visualizadas marcações fortes no interior de células gigantes, além disso, é possível visualizar significativa presença de marcações inespecíficas, resultantes da alta concentração de anticorpo primário utilizado. Já na figura 12 – B, em que a titulação de anticorpos foi de 1:20, as reações inespecíficas são discretas. Na figura 13 – A, B e C são mostradas as três formas de controle realizadas.

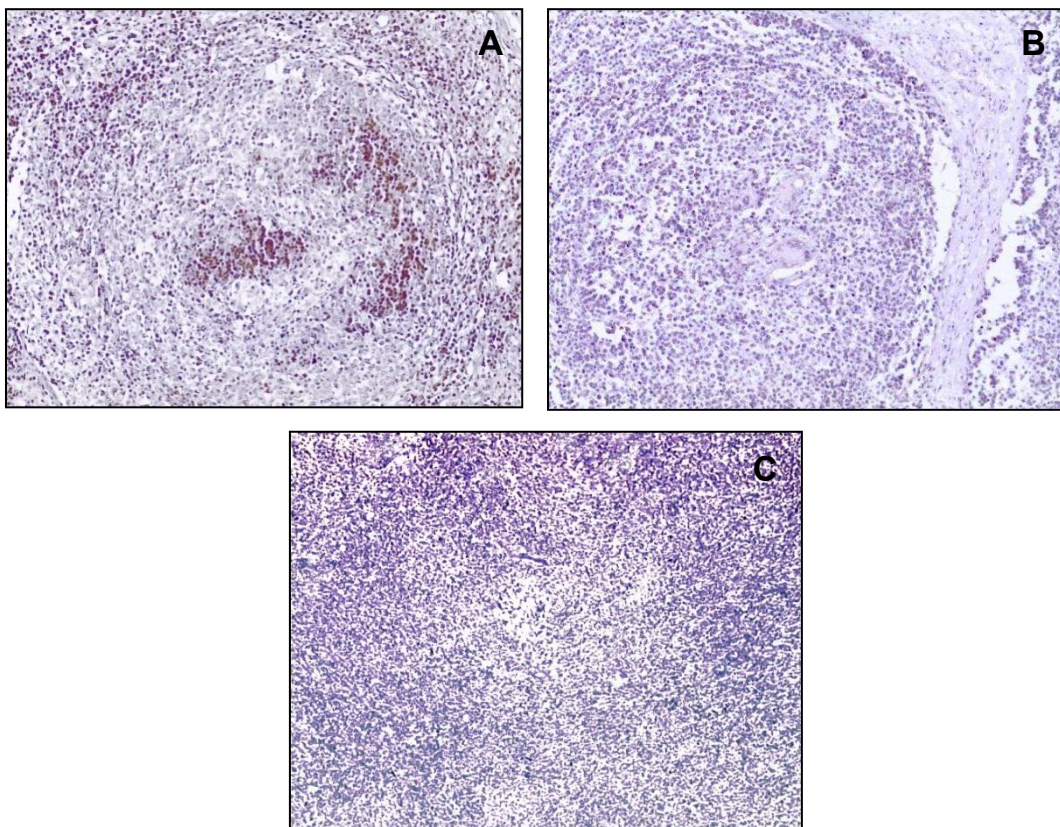


Figura 13: Testes imunoistoquímicos. **A:** Linfonodo inguinal superficial, controle positivo, marcação no interior de folículo linfóide, título 1:20 (100x). **B:** Linfonodo inguinal superficial, controle positivo, porém, sem aplicação do anticorpo primário, ausência de reações (100x); **C:** Linfonodo inguinal negativo para PCV2, ausência de reações, título 1:20 (100x). Contracoloração: hematoxilina de Harris, DAB.

Como controle positivo do teste foi utilizado fragmento de linfonodo inguinal superficial de suíno conhecidamente positivo para o PCV2, sobre o qual obteve-se reações positivas para a maioria das titulações testadas, onde as marcações são claramente visíveis no interior de folículos linfóides (Figura 13 – A). Este mesmo fragmento foi utilizado também como controle negativo para o anticorpo primário Anti Cap-PCV2, em que alguns cortes não foram submetidos à esta exposição. Neste caso, foram obtidas em todos os testes reações negativas (Figura 13 – B). O controle negativo para o teste (Figura 13 – C) foi realizado em fragmento de suíno conhecidamente negativo para PCV2 e, nesta amostra, algumas reações inespecíficas de fundo foram observadas, principalmente quando o anticorpo primário foi utilizado na titulação de 1:10. Entretanto, não foram observadas marcações que indicassem a presença do PCV2 neste último controle.

O fato de marcações imunoistoquímicas estarem presentes em algumas células gigantes e ausentes em outras na mesma amostra histológica, pode ser consequência da eliminação viral daquele sítio, conseqüentemente, a observação destas marcações dependerá do estágio em que estas células se encontram. Todavia, McNeilly et al. (1999) afirma que uma exposição prolongada à formalina durante o processamento das amostras pode ter influência sobre a proteína viral na amostra.

Taylor et al. (2008) expõem que soros policlonais contêm anticorpos para uma variedade de antígenos e isso os torna potencialmente capazes de causar reações inespecíficas e até mesmo, serem menos específicos. A produção de anticorpos policlonais por protocolos de múltipla adsorção para uma variedade de antígenos poderá aumentar sua especificidade. Anticorpos policlonais podem ser mais sensíveis que anticorpos monoclonais, pois podem se ligar a uma variedade de diferentes epítomos de um único antígeno. O diagnóstico de sensibilidade, definido como a proporção de amostras conhecidamente positivas que apresentam resultado positivo ao teste, é estabelecido por comparação dos resultados do teste em um tecido conhecidamente positivo com resultados usando outros anticorpos que foram validados para o mesmo alvo a ser analisado ou usando um método não imunoistoquímico tal como cultivo ou PCR.

No presente estudo, optou-se por trabalhar somente com linfonodos já que, de acordo com Ramos-Vara et al. (2008), diluições de anticorpo podem variar para o mesmo antígeno, dependendo do tipo de tecido com o qual se trabalha (por exemplo, cérebro e tecido linfóide). Diferenças nas técnicas de processamento e outras variáveis podem requerer titulação de anticorpo para cada tipo de tecido. Os autores pontuam que duas a 10 titulações acima ou abaixo da titulação recomendada pelos fabricantes poderá ser um bom ponto de partida para se iniciar uma padronização.

Se um anticorpo ainda não foi testado, um estudo sistemático usando uma ampla variação de diluições pode ser necessário, bem como tempo de incubação prolongado com o anticorpo primário. Para anticorpos secundários e complexos de detecção em quites de detecção disponíveis comercialmente não se faz necessário a realização de estudos de titulação, podendo ser seguida aquela titulação recomendada pelo fabricante (HSI, 2001). Os resultados obtidos na imunoistoquímica se mostrarem satisfatórios em detectar antígenos virais presentes nos tecidos, entretanto, é necessário aperfeiçoar a técnica. Alguns fatores envolvidos devem ser revistos, desde aqueles fatores que envolvem a produção do antígeno utilizado para produção do soro hiperimune, a preservação e tratamento das amostras antes de serem utilizadas, até a realização do protocolo imunoistoquímico adotado.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Obteve-se sucesso na purificação da proteína recombinante e na produção de um soro hiperimune em coelhos a partir desta. A afinidade de ligação do anticorpo produzido ao antígeno (proteína recombinante) foi demonstrada pelas técnicas de *Western blotting* e ELISA e foi considerada eficiente e sensível.

A técnica de imunocitoquímica permitiu verificar a capacidade de ligação do anticorpo produzido ao antígeno do capsídeo viral, presente em cultivo de células PK15. Conclui-se com este resultado que anticorpos produzidos a partir da proteína recombinante como ferramenta diagnóstica para identificação do patógeno em tecidos. No entanto, estudos futuros devem ser continuados objetivando reduzir ou eliminar as marcações inespecíficas encontradas, bem como a titulação ideal do anticorpo primário a ser utilizada.

A técnica de imunoistoquímica apresentou resultados satisfatórios, pois identificou antígenos em amostras conhecidamente positivas e em amostras colhidas de animais sintomáticos, além disso, não houve marcações em amostra conhecidamente negativa. Ajustes de protocolos e metodologias devem ser revistos para diminuição das reações inespecíficas. A seleção de epítomos imunorreativos da Cap-PCV2 para produção de soro hiperimune pode representar uma metodologia promissora na elaboração de testes de diagnósticos ainda mais específicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (2007). **Disponível em:** <http://www.abipecs.org.br>. Acessado em 02/01/2008.

ALLAN, G. M., MCNEILLY, F., FOSTER, J. C., ADAIR, B. M. Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. **Veterinary Microbiology**. n. 41, p. 267-279, 1994a.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine**. n. 41, p. 17-26, 1994b.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARK, E. D.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the United States of America and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 10, p. 3-10, 1998.

ALLAN, G. M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J. C.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S. J.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**. n. 121, p. 1-11, 1999.

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 12, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G. M. **PMWS/PCVD: Diagnosis, disease and control: What do we know?** In: International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, Dinamarca, 2006, p. 1-9.

ARNOLD, M. M.; SRIVASTAVA, S.; FREDENBURGH, J. et al. Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. **Biotech. Histochem**. n.71, p. 224-230, 1996.

BARBIERI, M. R.; CARVALHO M. G.; ZAMBOLIM E. M.; ZERBINI F. M. Expressão em *Escherichia coli* da Proteína Capsidial do *Watermelon mosaic virus* e Produção de Anti-Soro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 215-219, 2004.

BARCELLOS, D. A., PESCADOR, C. E. Circovirose Suína. **Sanidade em foco**. v. 6, n. 3, 2003.

BASSAMI, M. R.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G. E.; RAIDAL, S. R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotides sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plants circoviruses, and chicken anemia virus. **Virology**. v. 249, p. 453-459, 1998.

BIAGINI, P. Human circoviruses. **Vet. Microbiol.** v. 98, p. 95-101, 2004.

BURCH, D. Are we underestimating the impact of PCV2. **Asian pork magazine**. v. 6, p 26-27, 2008.

CASTRO, A. M. M. G.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; RUIZ, V. L. A.; LEOMIL, H.; RICHTZENHAIN, L. J. Partial sequencing of open reading frame-1 (ORF-1) of brazilian porcine circovirus type 1 (PCV-1). **Virus Reviews & Research**. n. 13., p. 80-81. 2003.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of etiology, diagnosis and pathology. **Veterinary Journal**. v. 168, p. 41-49 2004.

CHANG, H. W.; JENG, C. R.; LIU, J. J.; LIN, T. L.; CHANG, C. C.; CHIA, M. Y.; TSAI, Y. C.; PANG, V. F. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. **Veterinary Microbiology**. v. 108, p. 167-177, 2005.

CHANG, H. W.; JENG, C. R.; LIN, T. L.; LIU, J. J.; CHIOU, M. T.; TSAI, Y. C.; CHIA, M. Y.; JAN, T. R.; PANG, V. F. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 110, p. 207-219, 2006a.

CHANG, H. W.; PANG, V. F.; CHEN, L. J.; CHIA, M. Y.; TSAI, Y. C.; JENG, C. R. Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**. v. 115, p. 311-319, 2006b.

CHEUNG, A. K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. **Virology**. n. 313, p. 452-459, 2003a.

CHEUNG, A.K., Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology**. v. 305, p. 168-180, 2003b.

CHIARELLI NETO, O.; SILVA JR, A.; CASTRO, L. A.; WINTER, V.; SILVA, F. M. F.; BONFÁ, G.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Detecção do Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em animais de abate no centro norte do estado do Espírito Santo. **Scientia : revista do Centro Universitário Vila Velha - SEDES/UVV**. v. 7, n. 1/2, p. 33-44, 2006.

CHOI, C.; CHAE, C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**. v. 123, p. 302-305, 2000.

CHOI, C.; CHAE, C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. **Veterinary Pathology**. v. 38, p. 436-441, 2001.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo Circovírus Suíno. In: **Anaiscongresso mercosur de producción porcina**, 2000, Buenos Aires. p.16, 2000.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, p. 522-527, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; ASCOLI, K.; SIMON, N.; MORÉS, N.; OLIVEIRA, S.R.; KRAMER, B. Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2): A pathogenic emerging disease virus identified in archived tissues from brazilian swine herds. In: **Anais XV National Meeting of Virology**, Brazil. v. 09, n. 1, p. 99-100, 2004.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; SIMON, N.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D., Identification of porcine circovirus type 2 by polymerase chain reaction and immunohistochemistry on archived porcine tissues since 1988 in Brazil. **Ciência Rural**. n. 36, p. 1480-1485, 2006.

CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; DOMÍNGUEZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 94, p. 63–75, 2003.

CLARK, E. G. Post-weaning wasting syndrome. **Proceedings of the American Association of Swine Practitioners**. v. 28, p. 499-501, 1997.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. The complete nucleotide sequences of the coat protein cistron and the 3' non-coding region of a newly-identified potyvirus infecting sweetpotato, as compared to those of sweetpotato feathery mottle virus. **Archives of Virology**. v. 139, p. 327-336, 1994.

CONTRELL, T. S.; FRIENDSHIP, R. M.; DEWEY, C. E.; JOSEPHSON, G.; ALLAN, G.; WALKER, I.; MCNEILLY, F. A study investigation epidemiological risk factors for porcine circovirus type II in Ontario. **Pig Journal**. v. 44, p. 10-17, 1999.

DAFT, B.; NORDHAUSEN, R. W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. **39th Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**. Little Rock, Ar, USA, p.32, 1996.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. **Archives of Virology**. v. 149, p. 857-874, 2004.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G. M.; WILSON, P.; STROKAPPE, J. H.; MARTIN, K. M. C.; NEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesion of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**. v. 39, p. 44-51, 1998.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal Veterinary and Diagnostic Investigation**. v. 11, p. 3-14, 1999.

FERNANDES, L. T.; ZANELLA, J. R. C.; SOBESTIANSKY, J.; SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C. Experimental co-infection of SPF pigs with porcine circovirus type 2 isolated in Brazil and porcine parvovirus. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, 2006.

FRANÇA, T. N. **Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro**. Seropédica, 2004, 110f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

FRANÇA, T. N.; PEIXOTO P. V.; BRITO M. F.; DRIEMEIER, D.; MORÉS N.; ZANELLA, J. Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 25, n. 1, p. 39-53, 2005.

FRANZA, B. R.; RAUSCHER, F. J.; JOSEPHS, S. F.; CURRAN, T. The Fos complex and Fos relate antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. **Science**. v. 239, p. 1150-1153, 1988.

GAVA, D. **Padronização de técnicas de diagnostic para *Circovirus* suíno tipo 2 e estudo do papel do macho na epidemiologia da doença**. Lages, 2006 96f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, 2006.

GIRARD, C.; MORIN, M.; ELAZHARY, Y. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia. **Veterinary Records**. v. 130, p. 206-207, 1992.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**. v. 128, p. 23–35, 2008.

HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; HWANG, K. K.; CHAE, C. Synthetic peptide-derived antibody-based immunohistochemistry for the detection of porcine circovirus 2 in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Comp. Path.** v. 1, p. 1–4, 2005.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**. n. 72, p. 5262-5267, 1998.

HARDING, J. C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. In: Proc. Am. Assoc. Swine Pract. **Anais. 27th Annual Meeting**. v. 503, 1997.

HARDING, J. C.; CLARK, E. G.; STROKAPPE, J. H.; WILLSON, P. I.; ELLIS, J. A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. **Swine Health Production**. n. 6, p. 249-254, 1998.

HARDING, J. C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**. v. 98, p. 131-135, 2004.

HARMS, P. A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome-case studies. In: **Anais...** Proceedings of the seventh annual iowa swine disease conference on swine practitioners, 1999, p. 43-47, 1999.

HASSLUNG, F. C.; BERG, M.; ALLAN, G. M.; MEEHAN, B. M.; MCNEILLY, F.; FOSSUM, C. Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs. **Journal General Virology**. v. 84, p. 2937-2945, 2003.

HIRAI, T.; NUNOYA, T.; IHARA, T.; SAITOH, T.; SHIBUYA, K.; NAKAMURA, K. Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 68, p. 179-182, 2006.

HSI, E. D. A practical approach for evaluating new antibodies in the clinical immunohistochemistry laboratory. **Arch. Pathol. lab. Med.** v. 125, p. 289-294, 2001.

JU, C.; FAN, H.; TAN, Y.; LIU, Z.; XI, X.; CAO, S.; WU, B.; CHEN, H. (2005). Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n.3-4, p.179-190, 2005.

KAMSTRUP, S.; BARFOED, A. M.; FRIMANN, T. H.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; BOTNER, A. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. **Vaccine**. v. 22, p. 1358-1361, 2004.

KENNEDY, S.; SEGALÉS, J.; ROVIRA, A.; SCHOLÉS, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. **Journal of Veterinary and Diagnostic Investigation**. v. 15, p. 151-156, 2003.

KIM, J.; CHAE, C. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation. **Journal of Comparative Pathology**. v. 131, p. 121-126, 2004.

KIM, J.; CHUNG, H. K.; JUNG, T.; CHO, W. S.; CHOI, C.; CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 64, p. 57-62, 2002.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Records**. v. 155, p. 489-492, 2004.

KIUPPEL, M.; STEVENSON, G. W.; GALBREATH, E. J.; NORTH, A.; HOGENESCH, H.; MITTAL, S. K. Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. **BMC Veterinary Research**. v. 1, n. 7, 2005.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MCNEILLY, F.; RINGLER, S.; RINGS, D. M.; ALLAN, G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). **Veterinary Pathology**. v. 38, p. 31-42, 2001.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; WALDNER, C.; ALLAN, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, n.3, p.213-222, 2005.

KYRIAKIS, S. C.; SAOULIDIS, K.; LEKKAS, S.; MILIOTIS, C. H. C.; PAPOUTSIS, P. A.; KENNEDY, S. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**. v. 126, p. 38-46, 2002.

JOSEPHSON, G.; CHARBONNEAU, G. Case report of reproductive problems in a new startup operation. **Journal of Swine Health and Production**. v. 9, p. 258-259, 2001.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; NIELSEN, J.; STORGAARD, T.; BOTNER, A.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. **Veterinary Records**. v. 148, p. 759-760, 2001.

LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M.; MAGAR, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **Journal of Virology Methods**. v. 80, p. 69-75, 1999.

LEKCHAROENSUK, P.; MOROZOV, I.; PAUL, P. S.; THANGTHUMNIYOM, N. WAJJAWALKU, W.; MENG, X. J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine *Circovirus* (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. **Journal of Virology**. v. 78, p. 8135-8145, 2004.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**. v. 79, p. 8262-8274, 2005.

LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q.; CHUA, H.; KWANG, J. The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis In Vivo. **Journal of Virology**. n. 10, v. 80, p. 5065-5073, 2006.

LUKERT, P. D.; DE BOER, G. F.; DALE, J. L.; KEESE, P.; McNULTY, M. S.; RANGLES, 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. **Virus Taxonomy: Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vienna and New York: Springer Verlag, p. 166-168, 1995.

MAHE, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C.; ARNAULD, C.; LE CANN, P.; CARIOLET, R.; MADEC, F.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. **Journal of General Virology**. v. 81, p. 1815-1824, 2000.

MCNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; FOSTER, J. C.; ADAIR, B. M.; McNULTY, M. S. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function and Immunopathology. **Veterinary Immunology**. v. 49, p. 295-306, 1996.

MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B. M.; FOSTER, J. C.; CLARKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods*. v. 80, p. 123-128, 1999.

MEEHAN, B. M.; CREELAN, J. L.; McNULTY, M. S.; TODD, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plants circoviruses. **Journal of General Virology**. v. 78, p. 221-227, 1997.

MEEHAN, B. M.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V. A.; ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; CLARCK, E. G.; HAINES, D. M.; ALLAN, G. M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. **Journal of General Virology**. v. 79, p. 2171-2179, 1998.

MISINZO, G.; MEERTS, P.; BUBLOT, M.; MAST, J.; WEINGARTL, H. M.; NAUWYNCK, H. J. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. **Journal of General Virology**. v. 86, p. 2057-2068, 2005.

MONNERAT, F. S. **Desenvolvimento de técnicas biomoleculares para diagnóstico de circovírus suíno**. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2003, 74p.

MORÉS, N. Ecopatologia das doenças entéricas dos suínos na maternidade e creche. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E INDUSTRIALIZAÇÃO DE SUÍNOS, I., 1995, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CTC/ITAL. p. 55-63. 1995.

MORÉS, N. **Impacto econômico da Circovirose na produção de suínos**. In: V Seminário Internacional de Aves e Suínos - Avesuis, Florianópolis, SC, 2007, 9-13 p.

MORGAN, J. M.; NAVABI, H.; FASANI, B. Role of calcium chelation in high-temperature antigen retrieval at different pH values. **J. Pathol**. v. 182, p. 233-237, 1997.

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. J.; PAUL, P. S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiological**. v. 36, p. 2535-2541, 1998.

NAYAR, G. P.; HAMEL, A.; LIN, L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Canadian Veterinary Journal**. v. 38, p. 385-386, 1997.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S. R.; HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; PAUL, P. S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **Journal of General Virology**. v. 81, p. 2281-2287, 2000.

NIELSEN, J.; VINCENT, I. E.; BOTNER, A.; LADEKAER-MIKKELSEN, A. S.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. C. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 92, p. 97-111, 2003.

NELSON, D. L.; COX, D. L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E. G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J. A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Veterinary Journal**. v. 42, p. 551-553, 2001.

OHLINGER, V. F.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. **Studies on pathogenic aspects of the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)**. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress. 2000.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. **Virology**. v. 357, p. 175-185, 2007.

OPRIESSNIG, T.; JANKE, B. H.; HALBUR, P. G. Cardiovascular lesions en pigs naturally e experimentally infected with Porcine Circovirus type II. **Journal of comparative pathology**. n 20, p. 1-6, 2005.

PALLARES, F. J.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S. D.; VILLAR, D.; JANKE, B. H.; YAEGER, M. J.; LARSON, D. J.; SCHWARTZ, K. J.; YOON, K. J.; HOFFMAN, L. J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary and Diagnostic Investigation**. v. 14, p. 515-519, 2002.

PARK, J. S.; HA, Y.; KWON, B.; CHO, K. D.; LEE, B. H.; CHAE, C. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. **J. Comp. Path.** 2009, v. 1, p. 1-4, 2009.

PENSAERT, M. B.; SANCHEZ, R. E.; J. R.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; ALLAN, G. M.; NAUWYNCK, H. J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiological**. v. 98, p. 175-183, 2004.

QUINTANA, J.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J. M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Records**. n. 149, p. 357-361, 2001.

RAMAMOORTHY, S.; MENG, X.J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. **Animal Health Research Reviews**. v. 2, p. 1-20, 2008.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ M. E.; MILLER, M. A., et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Vet. Pathol.** v. 37, p. 597-608, 2000.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; MILLER, M. A. Veterinary diagnostic immunohistochemistry: a survey of 47 laboratories. **J. Histotechnol.** v. 28, p. 19-23, 2005.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 20, p. 393-413, 2008.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathologia.** v. 120, p. 59-78, 1999.

SALGADO, R. L. **Expressão e otimização da purificação da proteína do capsídeo do Circovírus suíno 2 e sua utilização na técnica de ELISA indireto.** Monografia de conclusão de curso de Bacharelado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008, 35p.

SEGALES, J.; ALONSO, F.; ROSELL, C.; PASTOR, J.; CHIANINI, F.; CAMPOS, E.; LOPEZ-FUERTES, L.; QUINTANA, J.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.; CALSAMIGLIA, M.; PUJOLS, J.; DOMINGUEZ, J.; DOMINGO, M. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 81, p. 37-44, 2001.

SEGALES, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **The Veterinary Quarterly.** n. 24, p. 109-124, 2002.

SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; ROSELL, C.; SOLER, M.; MALDONADO, J.; MARTIN, M.; DOMINGO, M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. **Veterinary Microbiological.** n. 85, p. 23-30, 2002.

SEGALES, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiological.** v. 98, p. 137-149, 2004.

SHANG, S. -B.; JIN, Y. -L.; JIANG, X. -T.; ZHOU, J.-Y.; ZHANG, X.; XING, G.; HE, J. L.; YAN, Y. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus Type 2. **Molecular Immunology.** v. 46, p. 327-334, 2009.

SILVA, F. M. F. **Utilização da PCR em tempo real na detecção e quantificação de PCV2 em diferentes órgãos de suínos clinicamente saudáveis e apresentando PMWS.** Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008, 80p.

SILVA JÚNIOR, A.; CASTRO, L. A.; CHIARELLI NETO, O.; SILVA, F. M. F.; VIDIGAL, P. M. P.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, p. 76-82, 2009.

SILVA JÚNIOR, A. **Circovirus suíno tipo 2 (PCV2): caracterização molecular e construção de vetores para expressão da proteína do capsídeo**. Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005, 80p.

SILVA JÚNIOR, A. **Desenvolvimento de antígenos recombinantes do circovirus suíno 2 e avaliação da imunogenicidade em modelo murino**. Tese de doutorado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008, 89p.

SILVEIRA, P. R. S.; TALAMINI, D. J. D. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. a. 13, n. 42, 2007.

SIPOS, W.; DUVIGNEAU, J. C.; WILLHEIM, M.; SCHILCHER, F.; HARTL, R. T.; HOFBAUER, G.; EXEL, B.; PIETSCHMANN, P.; SCHMOLL, F. 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**. v. 99, p. 63-71, 2004.

SIPOS, W.; DUVIGNEAU, J. C.; PIETSCHMANN, P.; SCHILCHER, F.; HOFBAUER, G.; HARTL, R. T.; SCHMOLL, F. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) is associated with a systemic cytokine expression profile indicative of proinflammation and a Th1 bias. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 107, p. 303-313, 2005.

SHUAI, J.; LI, X.; CHEN, N.; CHEN, X.; FANG, W. Characterization and potential use of truncated PCV2 capsid protein and its polyclonal antibody for diagnosis of PCV2 infections. **Acta Microbiological Sinica**. v. 48, p. 1-5, 2008.

SMITH, W. J.; THOMSON, J. R.; DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. **Veterinary Record**. n. 132, p. 47, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO, J. R. P.; SEYBOTH, L.; MATOS, N. Circovirose suína e Circovírus suíno. **Sanidade em foco**. n. 4, p. 52, 2002.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doença dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007.

STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. **Virology**. v. 291, p. 152-160, 2001.

TAYLOR, C. R.; SHI, S. R.; BARR, N. J.; et al., 2006. In.: RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J. Ve. Diagn. Invest.** v. 20, p. 393-413, 2008.

THIBAULT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M. C.; D-ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Veterinary Pathology**. n. 35, p. 108-116, 1998.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell line. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg**. v. 226; p. 153-167, 1974.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**. v. 295, p. 64-66, 1982.

TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S.; GERMANN, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. **Archives of Virology**. v. 140, p. 737-743, 1995.

TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. **Vet. Microbiol**. v. 98, p. 269-174, 2004.

THOMSON, J. R.; HIGGINS, R. J.; SMITH, W. J.; DONE, S.H. Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome. Clinical and Pathological Features of Cases in the United Kingdom (1993–1998). **J. Vet. Med**. v. 49, p. 430–437, 2002.

UBA – União Brasileira de Avicultura, Relatório Anual. 2006/2007.

VEGA-ROCHA, S.; BYEON, I. J. L.; GRONENBORN, B.; GRONENBORN, A. M.; CAMPOS-OLIVAS, R. Solution Structure, Divalent Metal and DNA Binding of the Endonuclease Domain from the Replication Initiation Protein from Porcine Circovirus 2. **Journal of Molecular Biology**. v. 367, n. 2, p. 473-487, 2007.

VINCENT, I. E.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. C. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. **Immunology**. v. 120, p. 47-56, 2007.

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. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, p. 530-532, 1999.

WU, P. C.; CHIEN, M. S.; TSENG, Y. Y.; LIN, J.; LIN, W. L.; YANG, C. Y.; HUANG, C. Expression of the porcine circovirus type 2 capsid protein subunits and application to an indirect ELISA. **Journal of Biotechnology**. v. 133, p. 58-64, 2008.

ZHOU, J. Y.; SHANG, S. B.; GONG, H.; CHEN, Q. X.; WU, J. X.; SHEN, H. G.; CHEN, T. F.; GUO, J. Q. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. **Journal of Biotechnology**. v. 118, p. 76-87, 2005.