

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

“ANÁLISE ESTRUTURAL *IN SILICO* E EXPERIMENTOS DE EXPRESSÃO
HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS CAP DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2b (PCV2b)”

PÂMELA MERLO MARSON

Botucatu – SP

Fevereiro, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

“ANÁLISE ESTRUTURAL *IN SILICO* E EXPERIMENTOS DE EXPRESSÃO
HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS CAP DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2b (PCV2b)”

PÂMELA MERLO MARSON

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Angelo José Magro

Co-orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

Botucatu – SP

Fevereiro, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Marson, Pâmela Merlo.

Análise estrutural *in silico* e experimentos de expressão heteróloga de proteína Cap do circovírus suíno 2b (PCV2b) / Pâmela Merlo Marson. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Angelo José Magro

Coorientador: João Pessoa Araujo Jr.

Capes: 20804008

1. Suíno - Criação. 2. Circovírus. 3. Proteínas. 4. Células - Cultura e meios de cultura.

Palavras-chave: circovírus suíno; expressão heteróloga; modelagem de proteínas; modos normais; proteína Cap.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus pela fé, força, coragem, foco e alegria que sempre me irradiou durante toda essa minha caminhada nos mais adversos momentos.

Aos meus pais pelo apoio incondicional dedicado a mim em toda essa trajetória, e por toda compreensão em tanto tempo e momentos de ausência, porém em pensamentos sempre juntos.

AGRADECIMENTOS

São muitas pessoas que tenho a agradecer por fazerem parte dessa minha trajetória e terem tornado possível eu chegar até aqui.

Começo agradecendo ao meu orientador Prof. Dr. Angelo José Magro, por ter me aceito para orientação, pela oportunidade de aprender coisas novas, pela dedicação para a finalização desse trabalho e por toda sabedoria compartilhada. Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Pessoa Araujo Jr. por ter me aberto as portas do seu laboratório, o que me abriu pra novos desafios e oportunidades, além de muito aprendizado.

Agradeço também a Dra. Taís Fukuta da Cruz (IBTec -Unesp), pela ajuda no processamento das amostras e pela busca das sequências e alinhamentos; ao Prof. Dr. Rafael Plana Simões (FCA – Unesp Botucatu) pela grande ajuda com os *scripts*, sem eles alguns pontos desse trabalho seriam inviáveis; ao prof. Dr. David Perahia (*École Normale Supérieure Cachan - Paris-Saclay*) e ao doutorando Antoniel Augusto Severo Gomes (IBB – Unesp Botucatu), pela grande ajuda e cooperação para que este trabalho pudesse ser finalizado.

Um agradecimento especial a Dra. Sônia, que eu pude acompanhar por um tempo o desenvolvimento dos experimentos anteriores a este trabalho e por toda ajuda, auxílio e dedicação que me deu durante os meus experimentos; não posso esquecer de agradecer também ao “Divã da Sônia” que sempre me acolheu nos momentos mais críticos da pesquisa. Pode ter certeza que você fez toda a diferença para eu poder continuar nessa caminhada.

Agradeço ao professor Valber de Albuquerque Pedrosa, e seus orientados, Carol Rodrigues e João Paulo (Gazélio), pela acolhida nos experimentos que ocorreram em seu laboratório. Muito obrigada por toda dedicação, atenção e gentileza que tiveram comigo nessas inúmeras tentativas, pois foi muito tempo de vocês dedicados a mim.

Não podia me esquecer de toda jornada percorrida até aqui, todas as pessoas que passaram por mim não apenas nesses 2 anos de mestrado. Portanto agradeço ao prof. Dr. Hélio Langoni do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (FMVZ – Unesp Botucatu), onde estagiei durante grande parte da minha graduação no laboratório de Biologia Molecular aplicada a Zoonoses, que me rendeu muito aprendizado e muitos amigos queridos conquistados ali.

Falando na Zoonoses, não posso deixar de agradecer a Virginia B. Richini Pereira, por toda dedicação e por tudo que ensinou na “BioMol”; pela amizade, por toda a paciência que sempre teve comigo e por toda força que sempre me deu em todos os anos que estive lá. Tenha certeza que grande parte que sou hoje em laboratório e pesquisa devo aos ensinamentos que tive com você.

Aos meus queridos colegas e amigos de laboratório, Marina, Camila, Leila, Duroc, Claudia Tozatto, Claudia Filoni, Marianna, Ariani, Jacqueline, Taís, e Michelly, meu muito obrigada pela agradável convivência, pelas ajudas e cooperação nos momentos críticos, e por todas as conversas no café durante esses 2 anos de mestrado.

Aos funcionários do IBTec, por toda dedicação e amizade; Mari, Lilian, Edna, Raquel, pela simpatia dos “bons dias”, pelos “bate papos”, pela preocupação quando precisei passar a noite no laboratório, pelo cuidado ao chegar pela manhã depois de uma noite virada no laboratório. Podem ter certeza que esse carinho faz toda a diferença.

A seção técnica de pós-graduação, Davi, Garlane, Iolanda, Sandra e Tatiana, por toda paciência e gentileza que sempre me atendeu. Podem ter certeza que esse atendimento faz a diferença, principalmente nas loucuras de prazos e afins que nós, pós-graduandos, estamos sempre perdidos e apertados.

Aos meus amigos mais próximos que sempre estiveram ao meu lado nas comemorações e principalmente que sempre me acolheram nos momentos difíceis, Marina, Camila, Leila, Mirela, Sâmea, Ingrid e Duroc, por toda ajuda sempre. Por ouvir meus desabafos, pela preocupação, pelos “corres” de carro de um lado para o outro, pela dedicação quando preciso ficar além do horário no laboratório, pelo carinho que sempre tiveram comigo, pelos almoços e cafés intermináveis. São amigos queridos assim que sempre queremos perto mesmo estando longe! Eu sempre agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho.

Não posso esquecer de agradecer a minha República “Lar do Brioko Seco” e por todos os moradores que estão e que já passaram e que ainda estão por vir; Selene, Leila, Ramiro, Cris, Maysa e Ana (chegando com tudo rsrs...), podem ter certeza que deixaram um pedacinho de vocês, e que foi de grande aprendizado conviver com todos vocês. Preciso ressaltar e agradecer a Maysa pela parceria

nesses momentos finais. Desde a qualificação que estamos juntas, vivenciando os mesmos momentos, e ter alguém que compreende e que possa compartilhar isso de perto foi muito importante para “sobreviver” a tudo isso!

Um agradecimento mais que especial ao Rugby Botucatu, a essa Família Sacis que me acolheu de braços abertos e onde conquistei grandes amizades que levo para vida. Obrigada por todo carinho, por toda amizade, por toda diversão, pelos terceiros tempos inesquecíveis; obrigada por fazer de minhas terças e quintas um pouco mais doloridas fisicamente, porém com grande alegria. Obrigada por me abrir a um esporte tão especial com valores tão fortes, “Disciplina, Integridade, Respeito, Paixão e Solidariedade”, que com toda certeza fazem parte da minha vida hoje.

Agradecendo por último, mas não menos especial, a minha família. Meus pais, Mercedes e Aristeu, por sempre terem me apoiado nas minhas decisões incondicionalmente; por toda ajuda e toda confiança que sempre depositaram em mim; por entender das minhas ausências nas datas comemorativas e por sempre, sempre estarem ao meu lado me apoiando em tudo. Sem esse alicerce de vocês, nada disso seria possível. Meus queridos irmãos, Thaís e Thiago, que mesmo com a distância que sempre estamos compartilhando (pois a cada hora um está em um lugar diferente rsrs...), estamos sempre unidos e torcendo uns pelos outros; agradeço todo o carinho, as alegrias das conquistas e a torcida de todos os momentos desde sempre compartilhados; podem ter certeza que vocês estão no meu coração, não poderia ter família melhor. A meu cunhado Alessandro pelo apoio, e por sempre me “aturar” de agregada em sua casa pra eu ficar mais pertinho da Beatriz. A minha sobrinha afilhada Beatriz, por todo o “grude” e carinho que tem comigo; é muito gratificante ter um “serzinho” desse na “nossa cola”, pois nos faz querer ser cada vez melhor; a saudade as vezes aperta, mas pode ter certeza que você sempre está no meu coração. Família, amo vocês com todo meu coração.

E a Deus, para finalizar, pois sem ele nada disso seria possível. Agradeço a Ele todos os dias, pela família maravilhosa que me deu, aos amigos queridos que colocou no meu caminho; aos desafios que me ofereceu para que eu pudesse me superar sempre e a força e a coragem para que eu possa continuar minha caminhada da melhor forma possível.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - | Cadeia de Aminoácidos das mutações encontradas na proteína Cap | 34 |
| Figura 2 - | Representação em <i>cartoon</i> Monômero da proteína Cap do PCV2b-mut3 | 36 |
| Figura 3 - | Modelo nonamérico do capsídeo do PCV2b-mut3 | 37 |
| Figura 4 | Localização das mutações M72I, N77D e T200I na superfície do modelo nanomérico do capsídeo do PCV2b-mut3 | 38 |
| Figura 5 | Localização das mutações M72I, N77D e T200I na superfície de um monômero da proteína Cap do PCV2b-mut3 | 40 |
| Figura 6 | Exemplos de modos normais de vibração molecular calculados para os monômeros das proteínas Cap do PCV2b-w e PCV2b-mut3 | 42 |
| Figura 7 | Flutuação dos modos normais de vibração molecular dos C ^α das proteínas Cap do PCV2b-w | 43 |
| Figura 8 | Localização das porções menos flexíveis (em vermelho) presentes na superfície do modelo nonamérico. | 44 |
| Figura 9 | Gel de Poliacrilamida - SDS-PAGE para expressão com células de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pET28a(+) PCV2 | 47 |
| Figura 10 | Gel de Agarose - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para detecção de cDNA após extração de RNA total | 50 |
| Figura 11 | Transferência para Membrana de Nitrocelulose - Western Blot para detecção da proteína Cap do vírus PCV2b-w | 52 |

LISTA DE TABELA

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Frequências dos aminoácidos encontradas nas posições 72, 77 e 200 de 1600 sequências únicas de proteínas Cap do PCV2 alinhadas por meio da ferramenta de alinhamento múltiplo <i>MUSCLE</i> | 33 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – microgramas

µL – microlitro

Å – ångström – unidade de medida de comprimento

BL21(DE3) – Linhagem de *E. coli*

BSDV – Circovírus doenças bicos e penas dos psitacídeos

CaCV – Circovírus dos canários

CAV – Anemia infecciosa das galinhas

cDNA – DNA complementar sintetizado a partir de RNA

Células ST – células testiculares suínas

DH5 α – Linhagem de *E. coli*

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dsDNA – DNA fita dupla

E. Coli – *Escherichia coli*

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPC – Efeito citopatogênico

GAGs – Glicosaminoglicanos

GoCV – Circovírus dos gansos

IPTG – isopropil-β-D-galactosídeo. Agente indutor.

kb – Quilobyte

kDa - Kilodalton

M72I – Mutação na posição 72 do aminoácido Metionina pela Isoleucina

mAb – *Monoclonal antibodies* – Anticorpo monoclonal

mL – mililitro

mM – milimolar

mmol/L – milimol por litro

mRNA – RNA mensageiro

N77D – Mutação na posição 77 do aminoácido Asparagina pelo Ácido Aspártico

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* – Banco de dados público

ORF1 – Fase de Leitura Aberta 1; codifica a proteína Rep.

ORF2 – Fase de Leitura Aberta 2 – codifica a proteína Cap

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCAVD – Doença Associada ao Circovírus Suíno

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PCV – Circovírus suíno

PCV1 – Circovírus Suíno 1

PCV2- circovírus suíno 2

PCV2a – Circovírus suíno 2 genótipo a

PCV2b – Circovírus suíno 2 genótipo b

PCV2b-mut1 – Circovírus suíno 2 com 1 mutação

PCV2b-mut2 – Circovírus suíno 2 com 2 mutações

PCV2b-mut3 – Circovírus suíno 2 com 3 mutações

PCV2b-w – Circovírus suíno 2 b selvagem

PCV2c – Circovírus suíno 2 genótipo c

PCV2d – Circovírus suíno 2 genótipo d

PCV2e – Circovírus suíno 2 genótipo e

PCV2f – Circovírus suíno 2 genótipo f

PCVD – Doenças do circovírus suíno

PiCV – Circovírus dos pombos

Proteína Rep – proteína replicase

Proteína Cap – Proteína Capsídeo

PRRSV – Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva

RNA- Ácido Ribonucléico

SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese de Gel de Poliacrilamida

SMDSD – Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos Desmamados

ssDNA – DNA fita simples

T200I.- Mutação na posição 200 do aminoácido Treonina pela Isoleucina.

tRNA – RNA transportador

Sumário

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| 1. INTRODUÇÃO | 5 |
| 1.1 A Circovirose Suína | 5 |
| 1.2 Circovirose Suína: aspectos clínicos, patológicos, infecção e transmissão viral..... | 6 |
| 1.3 Aspectos biológicos e moleculares do circovírus e sua relevância para a patogenicidade do PCV2..... | 8 |
| 1.4 Identificação de epítomos estruturais da proteína Cap e implicações na resposta imune contra o PCV2..... | 12 |
| 1.5 Importância do estudo de variantes do PCV2 e identificação de um novo vírus mutante com destacado efeito citopatogênico <i>in vitro</i> | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 Análises computacionais..... | 18 |
| 3.1.1 Seleção e análise das sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas Cap..... | 18 |
| 3.1.2 Modelagem das subunidades (proteínas Cap) do capsídeo do PCV2b-mut3..... | 18 |
| 3.1.3 Análise da flexibilidade da proteína Cap do PCV2b-mut3..... | 19 |
| 3.2 Procedimentos experimentais..... | 21 |
| 3.2.1 Desenho e preparo dos primers..... | 21 |
| 3.2.2 Amplificação..... | 21 |
| 3.2.3 Análise qualitativa dos produtos de PCR..... | 21 |
| 3.2.4 Purificação do DNA após PCR..... | 22 |
| 3.2.5 Quantificação do DNA..... | 22 |
| 3.2.6 Sequenciamento de DNA | 22 |
| 3.2.7 Preparação dos vetores pET-28a(+) | 23 |
| 3.2.8 Purificação e quantificação dos plasmídeos..... | 23 |
| 3.2.9 Inserção da sequência codificadora da proteína Cap do PCV2b-w no vetor de expressão | 23 |
| 3.2.10 Expressão heteróloga da proteína Cap do PCV2b-w | 27 |
| 3.2.11 Estudos da presença de mRNA para expressão da proteína Cap do PCV2b-w | 28 |
| 3.2.12 Estudos de indução com diferentes concentrações de IPTG para expressão da proteína Cap do PCV2b-w e ensaios de Western Blot..... | 31 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 4.1 Estudos estruturais <i>in silico</i> | 33 |
| 4.1.1 Alinhamento múltiplo de sequências da proteína Cap e modelagem de uma porção do capsídeo do PCV2b-mut3 | 33 |
| 4.1.2 Localização das mutações pode influenciar a eficiência da infecção viral | 39 |
| 4.1.3 Mutações influenciam flexibilidade da proteína Cap do PCV2b-mut3 | 42 |
| 4.2 Estudos de expressão da proteína Cap do PCV2b-w | 46 |
| 4.2.1 Eletroforese SDS-PAGE após experimentos de expressão com células transformadas com o plasmídeo pET28a-PCV2 | 46 |
| 4.2.2 Experimentos para detecção de mRNA correspondente à sequência da proteína Cap do PCV2b-w nas células de <i>E. coli</i> transformadas com o vetor de expressão | 50 |
| 4.2.3 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE e Western Blot para diferentes tempos de indução e concentrações de IPTG | 52 |
| 5. CONCLUSÃO | 54 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

Marson, M. P. Análise estrutural *in silico* e experimentos de expressão heteróloga de proteínas Cap do circovírus suíno 2b (Pcv2b). Botucatu, 2018. 68p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociência, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A suinocultura vem alcançando grande desenvolvimento de técnicas eficientes associadas ao melhoramento genético, nutrição, manejo e sanidade. Entretanto, devido aos métodos intensivos de criação, os suínos se tornaram mais susceptíveis a um grande número de doenças infecciosas. Entre os mais importantes patógenos que afetam a indústria suinícola mundial está o circovírus suíno 2 (PCV2), um pequeno vírus icosaédrico, não-envelopado, de DNA circular, de fita simples (ssDNA), ambisenso, composta por 1767-1768 nucleotídeos. Este vírus é altamente resistente a variações ambientais e agentes desinfetantes, é endêmico no mundo todo e está associado a várias manifestações clínicas distintas, que acarretam importantes perdas econômicas aos produtores. Um dos fatores possivelmente implicados na patogenicidade do PCV2 é a proteína Cap, a unidade fundamental constituinte do capsídeo deste vírus. Estudos realizados pela equipe do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr., do Instituto de Biotecnologia da Unesp em Botucatu/SP, comprovaram que vírus com mutações em suas proteínas Cap isolados a partir de cultivo celular aumentavam a morte celular em culturas celulares infectadas. Estes resultados evidenciaram a importância do capsídeo nos mecanismos de infecção e patogenicidade do PCV2, tornando interessante a realização de estudos estruturais com as proteínas Cap mutantes. A execução de estudos estruturais *in silico* mostrou a baixa frequência das mutações identificadas na proteína Cap dos vírus provenientes do cultivo *in vitro* e também indicou uma clara diferença entre as propriedades físico-químicas dos novos resíduos de aminoácidos em relação àqueles substituídos. Estas alterações, associadas à localização dos resíduos na superfície viral e a menor flexibilidade das proteínas Cap dos vírus mutantes, indicaram a possibilidade de alterações estruturais/funcionais relevantes, incluindo a alteração da afinidade por receptores celulares e diminuição da efetividade de anticorpos produzidos

contra vírus vacinais. Foram também realizados trabalhos experimentais para a produção heteróloga da proteína Cap de um vírus selvagem, os quais envolveram ensaios de subclonagem da sequência de interesse em um vetor de expressão, testes de transcrição e experimentos de expressão protéica. Os resultados destes procedimentos foram compatíveis com a produção da proteína Cap, porém novos estudos são necessários para confirmar a produção da molécula alvo e melhorar o rendimento dos ensaios de expressão.

Palavras-chave: Circovírus suíno, proteína Cap, modelagem de proteínas, modos normais, expressão heteróloga.

Marson, M. P. *In silico* structural analysis and experiments for heterologous production of Cap proteins from porcine circovirus 2b (PCV2b). Botucatu, 2018. 68p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociência, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Swine breeding has achieved a high development based on genetic improvement, nutrition, management and sanity. However, due to the intensive breeding methods, swine have become more susceptible to a higher number of infectious diseases. Among the most important pathogens that affect the swine world industry is the porcine circovirus 2 (PCV2), a small, icosahedral, non-enveloped virus, ambisense single-stranded circular DNA, composed by 1,767-1,768 nucleotides. This virus is highly resistant to environmental variations and disinfecting agents, endemic worldwide and has been associated to several distinct clinical manifestations that entail important economic losses to the producers. One of the factors possibly implicated on the PCV2 pathogenicity is the Cap protein, the fundamental unity that constitutes this virus capsid. Studies performed by the group of Dr. João Pessoa Araújo Jr. from the Instituto de Biotecnologia da Unesp em Botucatu/SP, confirmed that viruses with mutated Cap proteins from cell culture increased cell death in infected cultures. Such results highlight the importance of capsid in the infection mechanisms and pathogenicity of PCV2 and the importance of structural and comparative studies with Cap protein structures. *In silico* structural studies showed the low frequency of the mutations identified in the mutant Cap proteins and also indicated a clear difference between the physico-chemical properties of the new amino acid residues in comparison to those found in the wild-type virus. These mutations, associated with the location of the mutated residues on the viral surface and the lower mutated Cap protein flexibility, could lead to relevant structural/functional changes, including alteration of affinity for cellular receptors and decreased effectiveness of antibodies produced against vaccine viruses. Experimental works aiming the heterologous production of a wild-type Cap protein were also carried out, which involved expression vector subcloning, transcription tests and protein expression experiments. The results of these

procedures were compatible with the production of the Cap protein, but further studies are needed to confirm the production of the target molecule and improve the yield of the expression assays.

Keywords: Porcine circovirus, Cap protein, protein modeling, normal modes, heterologous expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Circovirose Suína

A suinocultura alcançou nos últimos anos um grande desenvolvimento de técnicas eficientes associadas ao melhoramento genético, nutrição, manejo e sanidade. Entretanto, devido aos métodos intensivos de criação, estes animais se tornaram mais susceptíveis a um grande número de doenças infecciosas responsáveis por sérios prejuízos econômicos. No momento, um dos mais importantes patógenos que afetam a indústria suinícola mundial é o circovírus suíno 2 (*Porcine Circovirus 2* – PCV2). Este vírus, altamente resistente a variações ambientais e agentes desinfetantes (Allan *et al.*, 1994; Shibata *et al.*, 2003), é endêmico no mundo todo e está associado a várias manifestações clínicas distintas que têm sido definidas mais comumente como Doença do Circovírus Suíno (*Porcine Circovirus Disease* – PCVD) na Europa (Segalés *et al.*, 2005) ou, alternativamente, Doença Associada ao Circovírus Suíno (*Porcine Circovirus Associated Disease* – PCAVD) (Opriessnig *et al.*, 2007) na América do Norte.

O PCV2 apresenta ampla distribuição mundial em suínos domésticos, e é responsável por um conjunto de síndromes multifatoriais (Grau-Roma *et al.*, 2009). A síndrome que mais causa prejuízos na suinocultura é a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos desmamados (SDMSD), que foi inicialmente descrita em 1991 como uma doença esporádica caracterizada por perda de peso e icterícia (Clark, 1996; Harding, 1996). Uma descrição mais completa inclui dispnéia e diarréias, e podem acometer suínos na fase de engorda (Segalés *et al.*, 2005). Os animais acometidos pela SDMSD apresentam ainda lesões características multissistêmicas (encontradas em vários tipos de tecidos), principalmente nos órgãos linfóides (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999). De fato, a coinfeção por outros patógenos não tem sido relacionada somente à ocorrência da SDMSD, mas também ocorre em outras PCVDs que afetam órgãos mais específicos (Opriessnig & Halbur, 2012).

Apesar de ainda não existirem estimativas precisas acerca do impacto da circovirose suína na produtividade das granjas brasileiras, é fato que o PCV2 causa perdas econômicas significativas na suinocultura nacional,

decorrentes, entre outros problemas, do declínio das taxas de crescimento, queda da conversão alimentar e aumento dos gastos com antibióticos. Neste contexto, há um claro consenso entre os produtores brasileiros acerca da necessidade de um controle rigoroso do manejo e sanidade dos plantéis, além do estabelecimento de calendários adequados de vacinação. É preciso ressaltar, entretanto, que estas medidas não parecem ser suficientes para eliminar a ocorrência das PCVDs ao redor do mundo.

1.2 Circovirose Suína: aspectos clínicos, patológicos, infecção e transmissão viral

O primeiro relato de circovírus suíno foi descrito por Tischer *et al.* (1974) como partículas virais *picornavirus-like* encontradas em algumas culturas de células renais de suínos da linhagem PK/15 (ATCC-CCL 33), e posteriormente identificadas como circovírus suíno (PCV), sendo um pequeno vírus de DNA de fita simples e circular, icosaédrico e não envelopado (Tisher *et al.*, 1982). Desde então muitos estudos vêm sendo realizados em relação a patogenicidade do vírus, mostrando que o subtipo PCV1 é basicamente apatogênico (Tischer *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1995; Krakowka *et al.*, 2000), não causando nenhum tipo de perda econômica significativa para a suinocultura mundial. Entretanto, epidemias globais de PCVDs a partir da década de 1990 levaram à identificação do PCV2 como fator desencadeante necessário para o aparecimento destas doenças, embora este tipo viral também estivesse, assim como o PCV1, em circulação dentro da população mundial há vários anos (Allan *et al.*, 2012). Esta informação aponta claramente para a possibilidade de que mudanças no material genético do PCV2 estão implicadas na emergência de sua patogenicidade.

Historicamente, a SDMSD foi inicialmente descrita em 1991 como uma doença esporádica caracterizada por perda de peso e icterícia (Clark, 1996; Harding, 1996). Uma descrição mais completa do quadro clínico inclui ainda palidez da pele, dificuldade respiratória e diarreia, que podem afetar também suínos em fase de engorda (Segalés *et al.*, 2005). Os animais acometidos pela SDMSD apresentam ainda lesões características multissistêmicas

(encontradas em vários tipos de tecidos), principalmente nos órgãos linfóides (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999), lesões de pele nas extremidades, membros inferiores e região ventrocaudal (Zanella e Moraes, 2003), além de respiração ofegante e tosse (Liu *et al.*, 2002), pelos fracos (Albina *et al.*, 2001) e morte súbita (Mori *et al.*, 2000).

Tentativas de reproduzir experimentalmente a SDMSD revelaram que esta síndrome raramente foi desencadeada quando o PCV2 foi inoculado isoladamente (Bolin *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2003). Na grande maioria dos casos, a doença somente foi reproduzida quando o vírus foi associado a outros agentes infecciosos ou não-infecciosos (Allan *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2001; Opriessnig *et al.*, 2004; Rovira *et al.*, 2002). Portanto, manifestações clínicas em suínos afetados por PCV2, geralmente são associadas a outros fatores de infecção, pois suínos infectados com PCV2 podem não apresentar síndrome, e a incidência das síndromes pode estar relacionada a co-infecções virais e a patógenos bacterianos (Magar *et al.*, 2000; Albina *et al.*, 2001).

Desta forma, o PCV2 foi considerado um fator necessário, mas não suficiente por si só, para iniciar o desenvolvimento dos sintomas clínicos da SDMSD (Ellis, 2003; Tomás *et al.*, 2008). De fato, a coinfeção por outros patógenos não tem sido relacionada somente à ocorrência da SDMSD, mas também ocorre em outras PCVDs que afetam órgãos mais específicos como os pulmões e intestino ou provocam desordens reprodutivas que provocam o nascimento de leitões menores e aumentam a taxa de natimortos e a prevalência de mumificação fetal (Opriessnig & Halbur, 2012). A infecção por PCV2 acarreta desidratação, perda de peso, taquipnéia, dispnéia, icterícia (Harding, 1997; Zanella e Moraes, 2003), diarreia líquida (Balasch *et al.*, 1999), letargia (Allan *et al.*, 1999) e distúrbios do sistema nervoso (Harding, 1997), podendo ser caracterizados por tremores, desordens locomotoras, prostração (Albina *et al.*, 2001) convulsões (Nielsen *et al.*, 2003) e depressão (Choi *et al.*, 2002).

A transmissão do PCV2 ocorre principalmente por via oro-nasal e, por conseguinte, distribuída ao sistema linfático, respiratório, gastrointestinal e

urogenital, sendo o sangue, fezes e urina condutores contaminantes aos demais animais (Rossell *et al.*, 1999), além do sêmen (Larochelle *et al.*, 2000) e colostro (Shibata *et al.*, 2006) também serem vias de propagação viral. Ele pode ser transmitido pelas formas horizontal, vertical e pelo sêmen a partir dos animais infectados para os sadios (Kim *et al.*, 2001; Larochelle *et al.*, 2000). Outro fator importante é a transmissão via transplacentária, indicada por abortos e natimortos onde matrizes soro-negativas foram infectadas durante a prenhez (Allan & Ellis 2000; West *et al.*, 1999), podendo ser um fator economicamente importante. Um estudo de campo realizado para avaliar o efeito observado na SMDSD relatou que a viremia do PCV2 em porcas está relacionada com a mortalidade dos leitões, uma vez que a morte de leitões de porcas virêmicas foi maior em comparação com as porcas sem viremia, podendo associar a titulação de anticorpos contra PCV2 com a mortalidade dos leitões, indicando que anticorpos contra o PCV2 de origem materna podem proteger os leitões da morte (Calsamiglia *et al.*, 2007).

1.3 Aspectos biológicos e moleculares do circovírus e sua relevância para a patogenicidade do PCV2

Os circovírus são descritos como pequenos vírus icosaédricos (T = 1) não-envelopados, cujo material genético é constituído por uma molécula de DNA circular de fita simples (ssDNA) ambisenso, composta por aproximadamente 2000 nucleotídeos, o que os caracteriza por apresentar os menores genomas virais autônomos conhecidos (Todd *et al.*, 2005). Estes genomas apresentam uma organização bastante simples, onde duas ORFs (*open reading frames* – ORF1 e ORF2) principais que se sobrepõem de modo inverso são responsáveis por codificar, respectivamente, a proteína iniciadora do mecanismo de replicação do DNA viral (identificada como Rep) e a proteína componente do capsídeo viral (conhecida como Cap) (Todd *et al.*, 2005).

A estratégia de duplicação do material genético do PCV, denominada de *rolling circle replication* (Finsterbusch & Mankertz 2009), é bastante similar àquelas de vírus vegetais dos gêneros Geminivirus e Nanovirus e de plasmídeos da família pT181 (Timchenko *et al.*, 1999; del Solar *et al.*, 1998;

Gutierrez, 1999), e caracteriza-se pela conversão do genoma viral (DNA fita simples - ssDNA) em uma forma replicativa (DNA dupla fita - dsDNA). A proteína Rep é a responsável pela clivagem do DNA viral e início da replicação, sendo que a origem da replicação é caracterizada por uma estrutura em *stem-loop* com uma seqüência característica de nove nucleotídeos (5'-AAGTATTAC-3' no PCV2 e 5'-TAGTATTAC-3' no PCV1) no seu ápice, que é conservada em todos os circovírus. Próximo a esta estrutura, repetições do hexâmero 5'-CGGCAG e de pentâmeros também são encontradas. A ligação da Rep e Rep' na origem desestabiliza e relaxa a fita dupla de DNA e induz a exposição da seqüência de nove nucleotídeos como DNA de fita simples (DNA viral), o qual é posteriormente reconhecido e clivado pela Rep/Rep'. Enquanto a proteína Rep/Rep' está covalentemente ligada no fosfato-5' (5'-PO₄³⁻) do DNA clivado, a síntese unidirecional da fita *leading* é iniciada a partir do grupo hidroxila-3' (3'-OH) que funciona como *primer* para a DNA polimerase do hospedeiro (Steinfeldt *et al.*, 2007; Vega-Rocha *et al.*, 2007). Após um ciclo de replicação, a nova fita de DNA sintetizada é clivada novamente dentro da origem regenerada e o 5'-PO₄³⁻ é ligado no novo grupo 3'-OH. A replicação viral é demasiadamente dependente dos mecanismos celulares e o transporte do DNA viral ao núcleo é através da mitose, sendo que a síntese do DNA viral é ativada pelas enzimas celulares da fase S do ciclo celular (Tischer *et al.*, 1987, 1995). Portanto a replicação do vírus é estreitamente correlacionada à atividade mitótica e aos processos celulares de endocitose, onde a propagação do vírus ocorre pela associação entre as partículas virais com as cromátides irmãs das células filhas (Steiner *et al.*, 2008). Porém, eventos com relação à montagem e a liberação do PCV da célula ainda não foram esclarecidos (Finsterbusch & Mankertz, 2009).

A filogenia do Circovírus suíno (PCV) mostra que este vírus pertence à família *Circoviridae* e ao Gênero *Circovirus*, assim como outras espécies que infectam majoritariamente aves, como o circovírus causador da doença dos bicos e das penas dos psitacídeos (BFDV), o circovírus dos gansos (GoCV), o circovírus dos pombos (PiCV) e o circovírus dos canários (CaCV). Por sua vez, o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) é o único membro do gênero *Gyrovirus*, que também compõe essa família de vírus (ICTVdb, 2006). Com

exceção do PCV1, considerado não patogênico (Tischer *et al.*, 1986), as infecções causadas pelos circovírus em geral resultam em doenças que afetam o sistema imune (Mankertz *et al.*, 2004). A sequência nucleotídica completa do PCV1 (1759 bases) já foi descrita (Mankertz *et al.*, 1997; Meehan *et al.*, 1997) e, em um estudo realizado por Hamel *et al.* (1998) foi demonstrado que o PCV2 possui nove nucleotídeos a mais, totalizando 1768 bases. Para os dois tipos de PCVs foi encontrada uma homologia no DNA total de 76% (Morozov *et al.*, 1998). De fato, trabalhos de sequenciamento demonstraram que o PCV2 apresenta uma variedade genotípica significativa, uma vez que foram identificados três diferentes subtipos deste vírus (PCV2a, PCV2b e PCV2c) (Segalés *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2008). Posteriormente, foram identificados mais 2 genótipos, PCV2d e PCV2e, em diversos países (Guo *et al.*, 2010; Harmon *et al.*, 2015; Wiederkehr *et al.*, 2009; Xiao, Halbur, & Opriessnig, 2015). Um estudo mais recente, analisando a árvore filogenética do PCV2 sugere um sexto genótipo PCVf (Bao *et al.* 2017).

De modo bastante sugestivo, a análise de uma série de trabalhos permitiu correlacionar a maior incidência do subtipo PCV2b, observada em vários países a partir de meados dos anos 2000, com a ocorrência de casos mais severos de PCVDs (Rose *et al.*, 2012), embora alguns estudos não tenham sido capazes de confirmar esta hipótese ou identificar marcadores moleculares de virulência para o PCV2 (Opriessnig *et al.*, 2008; Reiner & Willems, 2008). Apesar da não identificação de marcadores de virulência até o presente momento, é bastante provável que mutações na ORF2, responsável pela síntese da proteína Cap, resultaram em uma variante mais virulenta do subtipo PCV2a, como demonstrado por Krakowa *et al.* (2012). Neste trabalho, os autores associaram a ORF1 de vírus implicados na ocorrência de SDMSD e outras PCVDs à ORF2 de amostras de vírus não patogênicos provenientes de amostras arquivadas. Desta forma, foram produzidas partículas virais geneticamente modificadas, que continham uma sequência de nove nucleotídeos encontrada em formas do PCV2a não associadas ao aparecimento de sintomas clínicos ou lesões características de qualquer uma das PCVDs conhecidas. Os resultados obtidos comprovaram, portanto, que a ORF2 realmente tornou os vírus produzidos incapazes de desencadear

qualquer processo patológico. Os autores também concluíram que a ausência de patogenicidade característica do vírus artificial está provavelmente relacionada à composição de seu capsídeo, já que a porção C-terminal da proteína Cap produzida pela ORF2 em questão apresenta uma sequência de três aminoácidos de caráter hidrofílico (Ala-Thr-Ala) ao invés da trinca hidrofóbica (Thr-Gly-Asn) típica das proteínas de capsídeo dos vírus patogênicos. Assim, com base neste trabalho, é possível supor que alterações da proteína Cap são especialmente importantes para o surgimento de formas mais virulentas do PCV2. Este achado pode ainda explicar a associação do PCV2b com quadros mais severos de PCVDs, uma vez que existe uma óbvia diferenciação genética entre as ORF2s dos subtipos virais já identificados. Esta suposição ganha ainda mais força quando se leva em conta que as proteínas de capsídeo do PCV1 (não patogênico) e do PCV2 (patogênico) apresentam um grau de diferenciação muito maior do que a observada entre suas respectivas proteínas Rep (Mankertz, 2012).

Existem ainda trabalhos que reforçam ainda mais a potencial contribuição da proteína Cap para a patogenicidade dos PCVs ao demonstrar que esta molécula é capaz de se ligar a diversos componentes celulares. Misinzo *et al.*, (2006) identificaram que glicosaminoglicanos (GAGs) que apresentam sulfato de heparina e sulfato de condroitina em sua composição são utilizados como receptores que permitem a entrada do PCV2 nas células de seus hospedeiros. Por sua vez, Mankertz (2012) demonstrou a ligação da proteína Cap a seis outras proteínas (MKRN1, gC1qR, Par-4, NAP-1, NPM1 e Hsp40) envolvidas em diferentes processos celulares, como, por exemplo, sinalização, transporte, regulação da reação imune inata e inibição/estimulação da replicação e transcrição de outros agentes virais.

1.4 Identificação de epítomos estruturais da proteína Cap e implicações na resposta imune contra o PCV2

Como já mencionado, a ORF2 do genoma do PCV2 guarda a informação genética necessária para a produção da proteína Cap, que, além de possuir papel estrutural preponderante, é o maior determinante antigênico do vírus (Nawagitgul *et al.*, 2000; Finsterbusch *et al.*, 2009). A importância antigênica desta proteína tem sido comprovada pelo desenvolvimento de múltiplos sistema de expressão *in vitro* para produzir a proteína Cap com vistas ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas (Liu *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005; Trundova & Celer, 2007; Liu *et al.*, 2008; Bucarey *et al.*, 2009; Marcekova *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Tu *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Neste contexto, a identificação dos epítomos virais é muito interessante para uma maior compreensão dos mecanismos de imunidade deflagrados pelo PCV2 e para o aprimoramento das tecnologias vacinais e de fins diagnóstico.

Mahé *et al.* (2000), por meio do estudo de proteínas Cap recombinantes produzidas em sistemas de expressão heteróloga baseados em plasmídeos e baculovírus, identificou seis peptídeos lineares que reagem com anticorpos policlonais presentes no soro de suínos imunizados. Quatro regiões imunodominantes foram identificadas, incluindo os segmentos de resíduos de aminoácidos 65-87, 117-131, 157-183 e 193-207. Uma comparação feita neste mesmo trabalho permitiu ainda aos autores apontar os segmentos dos epítomos possivelmente responsáveis pela produção específica de anticorpos contra o PCV1 e o PCV2. Shang *et al.* (2009) também apontaram, com o emprego de anticorpos monoclonais, outros quatro epítomos lineares (resíduos 156-162, 175-192, 195-202 e 231-233). Por sua vez, Lekcharoensuk *et al.* (2004) mapeou pelo menos três epítomos conformacionais (resíduos 47-63, 165-200 e 230-233) com base em vírus quiméricos PCV1/PCV2. Já Ge *et al.* (2013) considerou que a tecnologia de *phage display* seria uma forma mais eficiente de mapeamento dos epítomos da proteína Cap. Assim, estes autores construíram bibliotecas de heptapeptídeos que foram analisadas com anticorpos policlonais anti-proteína Cap de PCV2. O sequenciamento dos clones selecionados após algumas rodadas de *screening* mostrou oito regiões

principais implicadas no reconhecimento dos anticorpos que envolviam os segmentos de resíduos de aminoácidos 50-56, 62-67, 68-73, 79-84, 86-93, 102-107, 119-128 e 229-233. Ainda de acordo com os autores, excetuando-se apenas os segmentos 50-56 e 229-233, todos os outros foram capazes de induzir a produção de anticorpos anti-PCV2 em camundongos.

Como explicitado acima, informações a respeito de epítomos estruturais da proteína Cap são relativamente raras. Neste sentido, destaca-se o trabalho de Khayat *et al.* (2011), no qual foi elucidada a estrutura cristalográfica de um capsídeo de PCV2 com 2,3 Å de resolução obtido a partir de uma proteína Cap recombinante e também mapeados na superfície desta estrutura seis epítomos previamente identificados por Mahé *et al.* (2000). Quatro destes epítomos apresentaram resíduos localizados no exterior do capsídeo, enquanto que um deles estava situado totalmente na superfície interior da partícula viral. Provavelmente, de acordo com os autores, este último epítopo poderia ser acessível ao sistema imune do hospedeiro por meio de um processo denominado *breathing*, que resulta na exposição de polipeptídeos internos essenciais para a infectividade de certos vírus animais (Li *et al.*, 1994; Bothner *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 1998). Estes achados, aliados a um trabalho posterior de Liu *et al.*, (2013) que aponta que o anticorpo monoclonal (mAb) 8E4 pode reagir com determinadas cepas de PCV2b mAb 8E4-negativas após experimentos de mutação sítio-dirigidas, demonstram cabalmente que mesmo poucas alterações da proteína Cap são capazes de modificar as propriedades imunogênicas do PCV2 e, eventualmente, determinar o surgimento de variantes virais resistentes às vacinas comerciais disponíveis. Esta possibilidade foi confirmada por Xiao *et al.* (2012) por meio da identificação de duas cepas do PCV2 envolvidas em casos de suspeita de falha vacinal ocorridas nos Estados Unidos. O sequenciamento do genoma destes vírus mostrou que eles podiam ser classificados dentro do genótipo PCV2b, porém apresentavam, em suas respectivas extremidades 3', um códon AAG no lugar de um códon de terminação TAA encontrado em ORF2s dos demais PCV2s do mesmo subtipo. Assim, a consequente adição de um resíduo de aminoácido à proteína Cap pode, portanto, estar implicada na resistência vacinal apresentada por estes vírus. A relevância destes estudos é ainda realçada por

outros dois trabalhos recentes realizados com o objetivo de gerar vacinas mais eficientes com base em alterações estruturais das proteínas de capsídeo do PCV2. No primeiro deles, Hu *et al.* (2016) mostrou que a inserção de um epítipo do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* - PRRSV) em um determinado *loop* da proteína Cap não apenas continuou permitindo o processo de automontagem dos capsídeos do PCV2 como também induziu resposta imune contra o PCV2 e o PRRSV. Hung *et al.* (2017), por sua vez, investigaram a antigenicidade e imunogenicidade de peptídeos sintéticos derivados da proteína Cap para uma possível vacina. Os resultados destes experimentos demonstraram que amostras de soro coletadas de rebanhos infectados com PCV2 apresentaram imunorreatividade em testes de ELISA frente aos peptídeos sintéticos.

1.5 Importância do estudo de variantes do PCV2 e identificação de um novo vírus mutante com destacado efeito citopatogênico *in vitro*

Dentro do contexto apresentado, ficam claros as implicações imunológicas e o potencial biotecnológico relativos à identificação e estudo de mutações virais que possam provocar alterações estruturais no capsídeo do PCV2. Além disso, a investigação destas alterações estruturais pode também ajudar a compreender a biologia do PCV2 e os mecanismos de tropismo tecidual e patogênese do vírus.

Recentemente, experimentos conduzidos pela equipe do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr., do Instituto de Biotecnologia da Unesp em Botucatu/SP, reforçaram, de forma bastante sugestiva, a importância do capsídeo nos mecanismos de infecção e patogenicidade do PCV2b ao demonstrar que o acúmulo de determinadas mutações nas moléculas que compõem esta estrutura (proteínas Cap) aumentam a morte celular em culturas infectadas com três diferentes PCV2b mutantes (Cruz *et al.*, artigo submetido para publicação). Estes vírus, derivados do cultivo de um vírus selvagem (Cruz & Araujo Jr. 2014) originário de uma amostra de campo coletada no Estado de São Paulo (código *GenBank* KF374705.1) (denominado PCV2b-w),

apresentaram mutações cumulativas em suas ORF2 (responsável pela síntese da proteína Cap) (dados não publicados). O primeiro deles mostrou apenas a mutação T200I (treonina → isoleucina) (denominado PCV2b-mut1), enquanto que o segundo apresentou as mutações M72I (metionina → isoleucina) e T200I (treonina → isoleucina) (denominado PCV2b-mut2) e o terceiro as mutações M72I (metionina → isoleucina), N77D (asparagina → aspartato) e T200I (treonina → isoleucina) (denominado PCV2b-mut3). A avaliação do efeito citopatogênico (ECP) destes vírus *in vitro* demonstrou que os vírus com duas e três mutações promoveram a morte de células testiculares suínas (células ST) logo após a segunda passagem de cultivo. Este achado não é observado quando os vírus originais e com apenas uma mutação são cultivados sob as mesmas condições. O ECP observado é especialmente proeminente no cultivo do vírus com três mutações, onde é observada morte celular intensa por necrose logo após a terceira passagem. Os resultados do cultivo celular dos vírus selvagem e mutantes associados à natureza das mutações identificadas indicaram a ocorrência de possíveis alterações estruturais/funcionais nas subunidades do capsídeo.

Com base nestes achados, foram realizados neste trabalho análises computacionais estruturais envolvendo a proteína Cap com as mutações M72I, N77D e T200I. Estas análises incluíram o alinhamento da proteína Cap do PCV2b-mut3 com outras sequências depositadas em bancos de dados, além de estudos estruturais que investigaram a possível alteração da flexibilidade da proteína Cap induzida pela presença das três mutações em questão. Recentemente, com o intuito de possibilitar futuras análises estruturais experimentais, também foram realizados pela nossa equipe de trabalho estudos para a expressão recombinante em *E. coli* da proteína Cap do PCV2b-w, utilizando, para tanto, um vetor comercial (vetor pGS-21a) com a sequência de interesse e códons otimizados. Os resultados iniciais destes experimentos indicaram uma grande dificuldade para a expressão da proteína Cap do PCV2b no sistema empregado, o que exigia a elaboração de novos procedimentos. Assim, com vistas à solução deste problema, os trabalhos aqui apresentados incluíram ainda a subclonagem da sequência codificante da proteína Cap do PCV2b-w em um novo vetor de expressão (vetor pET-28^a(+)) e a execução de

novos experimentos para a produção heteróloga desta proteína. Até o momento, os resultados obtidos apontaram uma aparente expressão da proteína Cap em questão nas células bacterianas transformadas com o novo vetor (pET-28^a(+)) de mRNA codificante. Novos ensaios, entretanto, ainda devem ser realizados para a confirmação da produção heteróloga da proteína Cap do PCV2b-w. Da mesma forma, estes novos trabalhos também deverão objetivar o aumento dos níveis de produção da proteína Cap para a posterior execução de outros procedimentos envolvendo técnicas biofísicas estruturais, como, por exemplo, ensaios de cristalização e subsequentes experimentos de difração de raios X.

2. OBJETIVOS

A execução deste trabalho teve como finalidade o cumprimento dos seguintes objetivos:

- 1) Análise da frequência das mutações M72I, N77D e T200I encontradas na proteína Cap dos vírus PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 em comparação com outras sequências similares depositadas em bancos de dados;
- 2) Construção de um modelo tridimensional de parte do capsídeo do PCV2b-mut3 com vistas à determinação da posição espacial das mutações M72I, N77D e T200I no vírus;
- 3) Comparação da flexibilidade da proteína Cap do PCV2b-mut3 em relação ao PCV2b-w por meio de uma análise computacional baseada no cálculo dos modos normais de vibração molecular destas proteínas;
- 4) Produção da proteína Cap recombinante do PCV2b-w (código *GenBank* KF374705.1) por meio do emprego de células de *E. coli* e do vetor de expressão pET-28a(+) (*Novagen*®).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análises computacionais

3.1.1 Seleção e análise das sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas Cap

Para a análise da frequência das mutações M72I, N77D e T200I observadas foram selecionadas no banco de dados público do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) um total de 5.589 sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas Cap do PCV2b. Em seguida, as sequências únicas foram selecionadas por meio de um *script Python* e agrupadas em um arquivo fasta, de modo a excluir todas as demais sequências redundantes. As sequências restantes (1599 no total) e aquela correspondente à proteína Cap do vírus PCV2b-mut3 foram então alinhadas por meio da ferramenta de alinhamento múltiplo *MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)* (Edgar, 2004) implementada no programa *Geneious R8® (Biomatters, Auckland, New Zealand)*. O alinhamento resultante foi a seguir analisado com um novo *script Python* elaborado para determinar a frequência de resíduos de aminoácidos presentes nas posições 72, 77 e 200. Esta parte do trabalho foi executada em colaboração com a Dra. Taís Fukuta da Cruz e a doutoranda Camila Dantas Malossi, do Instituto de Biotecnologia (IBTec) da Unesp, campus de Botucatu/SP.

3.1.2 Modelagem das subunidades (proteínas Cap) do capsídeo do PCV2b-mut3

O modelo molecular de parte do capsídeo do PCV2b-mut3 foi construído com base na estrutura cristalográfica com 2,3 Å de resolução de uma proteína similar com uma sequência consenso determinada por Khayat *et al.* (2011) (código PDB 3R0R). Este modelo foi constituído por nove moléculas da proteína Cap, sendo três monômeros centrais e mais seis cadeias polipeptídicas, adicionadas para prover contatos de interface para todos os componentes da tríade central. Esta construção foi elaborada de modo a evitar uma alteração imprópria da estrutura terciária dos três monômeros centrais durante os procedimentos de minimização de energia do modelo nonamérico.

As mutações M72I, N77D e T200I foram introduzidas com o emprego do programa *Charmm v.c36a1* (Brooks *et al.*, 2009) e o estado de protonação dos resíduos de aminoácidos da estrutura nonamérica (com nove cadeias polipeptídicas) foi verificado com o programa PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004; 2007). O programa *Charmm v.c36a1* (Brooks *et al.*, 2009) foi então utilizado para refinar a estrutura nonamérica por meio da utilização de dois algoritmos para minimização de energia – gradientes conjugados (*Conjugated Gradients* - CG) e *Adopted Basis Newton-Raphson* (ABNR) – associados à aplicação de restrições harmônicas progressivamente decrescentes (250 a zero). Sete ciclos foram realizados para este procedimento, sendo que cada um dos primeiros seis ciclos foi executado em cem passos com uma tolerância de 1,0 ponto aplicada à média do gradiente calculado. Durante o sétimo ciclo, foram executados mil passos com uma tolerância de 0,01 ponto aplicada à média do gradiente calculado. A identificação das cavidades de superfície das proteínas Cap foi realizada pelo programa *LIGSITEcsc* (<https://omictools.com/ligsitecsc-tool>) (Huang & Schroeder, 2006), utilizando os seguintes parâmetros: *grid space* = 1 Å e *probe radius* = 5 Å. O desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation* - RMSD) entre os átomos C^α das subunidades da estrutura nonamérica e as subunidades da estrutura cristalográfica do capsídeo determinada por Khayat *et al.* (2011) foi calculado com o programa *VMD Molecular Graphics Viewer v.1.9.3* (Humphrey *et al.*, 1996).

3.1.3 Análise da flexibilidade da proteína Cap do PCV2b-mut3

Os modelos moleculares utilizados para esta análise foram os monômeros da proteína Cap dos vírus PCV2b-mut3 e PCV2b-w. Ambos os modelos foram construídos com base em um monômero da estrutura cristalográfica do capsídeo de PCV2 determinada por Khayat *et al.* (2011). As mutações necessárias para a construção dos modelos monoméricos foram introduzidas com o emprego do programa *Charmm v.c36a1*. Em seguida, arquivos de entrada (*inputs*) para a execução de simulações de dinâmica molecular para cada um dos monômeros foram gerados com o servidor *CHARMM-GUI* (Jo *et al.*, 2008) (<http://www.charmm-gui.org/>). A seleção dos

rotâmeros das cadeias laterais dos resíduos mutantes foi realizada com base em simulações iniciais de dinâmica molecular de 6 ps com temperatura de 10.000 K seguidas de uma suave minimização de energia dos sistemas com um algoritmo CG. Estas simulações iniciais foram repetidas vinte vezes para cada monômero, restringindo-se a movimentação dos átomos que não eram componentes das cadeias laterais dos resíduos mutantes. A estrutura com menor energia foi então selecionada para os procedimentos subsequentes. As simulações finais de dinâmica molecular foram então executadas com o programa *Charmm v.c36a1* de modo a promover uma otimização estrutural adicional para cada um dos modelos monoméricos. Estas simulações foram realizadas utilizando o campo de força *Charmm36* (Best *et al.*, 2012) e uma caixa cúbica contendo moléculas de solvente explícito e 100 mM de NaCl.

Cada sistema foi submetido a um processo de minimização de energia utilizando-se os algoritmos *SD* (*Steepest Descent*) e ABRN (50 passos cada), seguida de uma etapa de 100 ps de equilibração em NVT (volume e temperatura (300 K) constantes) e mais 100 ps de simulação livre em NPT (pressão (1 bar) e temperatura constantes). Nas duas últimas etapas, o algoritmo *SHAKE* (Ryckaert *et al.*, 1977) foi utilizado para limitar a distorção das ligações entre os átomos do sistema. O cálculo dos modos normais de vibração molecular foi executado em condição de vácuo com o programa *Charmm v.c36a1*. Um total de 103 modos normais de vibração molecular foram calculados, envolvendo todos os átomos dos modelos monoméricos das proteínas Cap dos vírus PCVb-mut3 e PCV2b-w até um gradiente menor que 10^{-6} kcal.mol.A⁻². As flutuações dos átomos C^α dos primeiros 20 modos normais de vibração molecular (7 ao 26) de cada monômero foram também calculadas com o programa *Charmm v.c36a1*. Os mapas de calor utilizados para analisar a variação de flexibilidade das proteínas Cap avaliadas foram gerados pelo programa *MATLAB*® v.2016. Esta parte do trabalho foi executada em colaboração com o doutorando Antoniel Augusto Severo Gomes, do Instituto de Biociências da Unesp, campus de Botucatu/SP.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Desenho e preparo dos primers

Os *primers* PCV2b-w *forward* (TAC CCC ATG GGT CAC CAC CAC CAC CAC CAC ATG ACC TAT CCG CGT) e PCV2b-w *reverse* (GGC ATA TGG TAT ACG GAT CCT TAC GGA TTC A) foram desenhados utilizando como base a sequência KF374705.1 (*GenBank*) com o auxílio do programa *Geneious* (Kearse *et al.*, 2012) e adquiridos junto à empresa *Invitrogen*[®]. Os *primers* foram sintetizados com sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *NdeI* para permitir a subsequente inserção da sequência de interesse no vetor de expressão pET-28^a(+). Para execução dos experimentos em questão, *primers* liofilizados foram diluídos em tampão Tris-HCl/EDTA (TE 1x) pH = 7,4 para uma concentração final de 100 pmol/L. Para a solução de trabalho usada nos experimentos de PCR foi realizada uma segunda diluição para a concentração final de 10 pmol/μL em água *nuclease-free*.

3.2.2 Amplificação

Para a execução das PCRs foi empregado o kit comercial *GoTaq*[®] *Long PCR Master Mix* (*Promega*[®]) com volume final de 25μL, conforme orientações do fabricante. Foi preparada também uma solução de controle negativo (ausência de DNA) nas mesmas condições com adição de água *nuclease-free* no lugar da amostra. As amostras (DNA plasmidial do pGS-21^a do vírus selvagem) foram submetidas a temperaturas variáveis: 94 °C para a desnaturação térmica inicial (10 minutos), seguida de 35 ciclos de desnaturação das fitas de DNA a 94 °C (30 s), anelamento e hibridização dos *primers* a 55°C (30s) e extensão a 72 °C (30s). Para a extensão final das fitas, foi aplicada a temperatura de 72 °C por 5 minutos e as amostras foram em seguida mantidas a 22 °C até a retirada do termociclador.

3.2.3 Análise qualitativa dos produtos de PCR

Uma alíquota do produto amplificado resultante das PCRs foi analisada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *SYBR*[®]

Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante. Para as corridas eletroforéticas das alíquotas foram aplicados 80 V por 10 minutos e 100 V por 20 minutos. O marcador de peso molecular *Quick-Load® DNA Ladder 1kb (New England Biolabs®)* foi utilizado como referência seguindo as orientações do fabricante, e a documentação dos géis foi realizada por meio do emprego do sistema *Syngene-Ingenius®*.

3.2.4 Purificação do DNA após PCR

Os produtos amplificados foram purificados com o uso dos kits *Illustra® GFX® PCR DNA* e *Gel Band Purification Kit® (GE Healthcare®)*, com base no protocolo sugerido pelo fabricante para a purificação de DNA a partir de misturas de PCR. Em seguida, o material amplificado foi armazenado a -20 °C até o momento de sua utilização.

3.2.5 Quantificação do DNA

Previamente aos demais procedimentos, as amostras amplificadas foram quantificadas com o emprego do espectrofotômetro *NanoDrop 1000® (ThermoScientific®)* e do fluorímetro *Double Stranded DNA Quantus® (Promega®)* em associação com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay® (Life Technologies, USA)* seguindo as instruções do fabricante.

3.2.6 Sequenciamento de DNA

As amostras contendo os produtos amplificados foram preparadas para sequenciamento utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems®)*, e a eletroforese capilar das amostras foi realizada com o sequenciador automático *ABI 3600® (Applied Biosystems®)*, seguindo as recomendações do fabricante. Para a execução destas análises foram utilizados os mesmos *primers forward* e *reverse* descritos anteriormente. As sequências obtidas foram alinhadas juntamente com a sequência ORF2 do

vírus PCV2b-w depositada no *GenBank* (código DQ923523) por meio do programa MEGA v.6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

3.2.7 Preparação dos vetores pET-28a(+)

Os vetores pET-28a(+) foram obtidos a partir de uma cultura de estoque de *Escherichia coli* cepa DH5 α armazenada a -80 °C. Para tanto, foram preparadas placas contendo meio ágar LB (Luria-Bertani) (1% triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% NaCl, 1,5% ágar bacteriológico) (Sambrook *et al.*, 1989) e canamicina na concentração de 30 μ g/mL. A solução contendo as bactérias transformadas foi então transferida para as placas com o auxílio de uma alça de platina (semeadura) e incubada a 37 °C por 16 horas (overnight). Colônias isoladas destas placas foram coletadas e multiplicadas em tubos Falcon contendo meio líquido LB com 30 μ g/mL de canamicina, sob agitação *overnight* de 200 rpm a 37 °C por 16 horas.

3.2.8 Purificação e quantificação dos plasmídeos

O DNA plasmidial foi extraído com o kit *E.Z.N.A. plasmid mini Kit I*[®] (*Omega Bio-tek*[®]) seguindo instruções do fabricante, e usado para diversas finalidades analíticas e para reações de restrição. A quantificação do DNA plasmidial foi feita com o espectrofotômetro *NanoDrop 1000*[®] (*Thermo Scientific*[®]) e com o fluorímetro *Double Stranded DNA Quantus*[®] (*Promega*[®]) em associação com o kit *Qubit ds DNA HS Assay*[®] (Life Technologies, USA), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram concentradas em um evaporador rotativo (Concentrador *PLUS - Eppendorf*[®]).

3.2.9 Inserção da sequência codificadora da proteína Cap do PCV2b-w no vetor de expressão

3.2.9.1 Digestão das amostras de DNA e do plasmídeo com enzimas de restrição

Nesta etapa, o fragmento de DNA contendo a sequência codificadora da proteína Cap do PCV2b-w e o vetor pET28a(+) foram submetidos,

separadamente, a uma reação de digestão dupla e simultânea com as enzimas de restrição *NcoI* e *NdeI* (*Thermo Scientific*[®]). O tampão indicado para o emprego destas enzimas foi o Tango 2X sendo preparada uma solução de reação para um volume final de 50 µL, conforme indicação do fabricante. As soluções testadas foram mantidas a 37 °C por 16 horas no termociclador e, após a digestão, uma temperatura de 65 °C foi aplicada durante 20 minutos para inativação das enzimas.

3.2.9.2 Análise qualitativa por gel de agarose

Após a reação dupla de restrição, alíquotas dos produtos foram analisadas qualitativamente por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *SYBR Safe DNA gel Stain*[®] (*Invitrogen*[®]), seguindo orientações do fabricante. Como controle negativo para a reação envolvendo o vetor, foi utilizado o DNA plasmidial do pET-28^a(+) fechado. Como referência, foi empregado o marcador *GeneRuler DNA Ladder*[®] 1kb (*Thermo Scientific*[®]), conforme instruções do fabricante. O gel resultante foi documentado por meio do emprego do sistema *Syngene-Ingenius*[®].

3.2.9.3 Purificação dos produtos de restrição a partir do gel de agarose

Os produtos de interesse, separados por eletroforese, foram purificados por meio dos kits *Illustra*[®] *GFX*[®] *PCR DNA* e *Gel Band Purification Kit*[®] (*GE Healthcare*[®]) com base no protocolo para a purificação do DNA, a partir de gel de agarose. Após a eluição do DNA, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o uso.

3.2.9.4 Quantificação dos produtos

Previamente aos demais procedimentos, as amostras foram quantificadas por meio do emprego do fluorímetro *Double Stranded DNA*

Quantus[®] (*Promega*[®]) em associação com o kit *Qubit ds DNA HS Assay*[®] (*Life Technologies*, USA).

3.2.9.5 Reação de Ligação e transformação do vetor

A reação de ligação foi realizada com uma proporção de 3:1 (inserto contendo a sequência codificadora da proteína Cap do PCV2-w : vetor pET28a(+)) e o emprego da enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs[®]) com tampão apropriado, conforme orientação do fabricante. A solução foi incubada a 16 °C por 16 horas e, após este período, aplicou-se 65 °C por 10 minutos para a inativação da enzima. O produto da reação de ligação foi refrigerado a 4 °C. Esse produto foi então usado para a nova transformação de bactérias *E.coli* da linhagem BL21(DE3): alíquotas de 10 µL foram inseridas em microtubos contendo 100 µL de solução de células competentes e submetidas a choque térmico, sendo então transferidas para 900 µL de meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) e mantidas a temperatura de 37 °C por 90 minutos sob agitação.

3.2.9.6 Propagação das colônias, Purificação e Congelamento das células transformadas

A solução obtida no item anterior foi utilizada para semear placas contendo meio LB ágar com canamicina (30 µg/mL), e incubadas *overnight* a 37 °C. Colônias isoladas das placas foram coletadas e propagadas em meio LB, com incubação a 37 °C *overnight* sob agitação. O DNA plasmidial recombinante de *E. coli* foi extraído com o E.Z.N.A.[®] *plasmid mini Kit I* (*Omega Bio-tek*[®]) e armazenado a -20 °C.

Alíquotas de 1,0 mL das culturas de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante em meio líquido LB, foram adicionadas em criotubos em 9% de glicerol e armazenadas a -80 °C para a execução de experimentos posteriores de expressão.

3.2.9.7 PCR, análise qualitativa por gel de agarose e sequenciamento do DNA plasmidial

Alíquotas do DNA plasmidial recombinante foram preparadas para duas reações de PCR realizadas com o kit *GoTaq Long PCR Master Mix*[®] (*Promega*[®]) com um volume de reação de 25 µL, conforme orientações do fabricante. Para a primeira reação foram utilizados os *primers* T7-PRO (TAATACGACTCACTATAGGG) como *forward sequencing primer* e o T7-TER (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) como *reverse sequencing primer*. Uma segunda reação de PCR com os *primers* PCV2b-w *forward* e *reverse* foi realizada para confirmar a orientação do inserto contendo o fragmento de interesse do DNA do vírus PCV2b-w. Uma alíquota do produto de ligação também foi preparada para PCR com a utilização dos *primers* T7 PRO e T7 TER. As três amostras em questão foram submetidas a uma sequência de temperaturas variáveis: 94 °C para a desnaturação térmica inicial (10 minutos), seguida de 35 ciclos de desnaturação das fitas de DNA a 94 °C (30 s), anelamento dos *primers* a 55 °C (30 s) e extensão a 72 °C (30 s). Para a extensão final das fitas foi aplicada a temperatura de 72 °C por 5 minutos e a amostra foi mantida a 22 °C até a sua retirada do termociclador.

Após as PCRs, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *SYBR Safe DNA gel Stain*[®] (*Invitrogen*[®]) conforme recomendações dos fabricantes. Para as análises qualitativas foi utilizado o marcador *Gene Ruler 1kb DNA Ladder*[®] (*ThermoScientific*[®]) seguindo orientações do fabricante, e os géis foram documentados com o sistema *Syngene-Ingenius*[®]. Estas amostras foram, em seguida, preparadas para sequenciamento utilizando-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*[®] e o aparelho de sequenciamento automático *ABI 3600*[®], ambos da *Applied Biosystems*[®], seguindo instruções do fabricante.

3.2.10 Expressão heteróloga da proteína Cap do PCV2b-w

3.2.10.1 Estudos de otimização para a expressão heteróloga das proteínas Cap

Para a expressão da proteína recombinante foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), após reação de transformação com o plasmídeo recombinante pET28a(+)-Cap, verificando-se as condições mais apropriadas de temperatura, concentração de agente indutor (IPTG) e tempo de indução. A propagação dessas bactérias foi realizada a partir da solução de estoque mantida a -80 °C com o plaqueamento em meio LB ágar contendo canamicina (30 µg/mL) e incubadas a temperatura de 37 °C por 16 horas. Colônias isoladas foram coletadas das placas para inóculo em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina (30 µg/mL). Estes inóculos foram incubados a 37 °C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Os controles negativos foram obtidos a partir de uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3) sem plasmídeo e de outra colônia de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo sem a sequência codificadora da proteína Cap do PCV2b-w. Uma fração de 1 mL de cada cultura foi transferida para 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico canamicina (30 µg/mL), sendo estas alíquotas de 21 mL posteriormente incubadas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, até uma absorbância entre 0,5 e 1,0; considerando-se o comprimento de onda de 600 nm (A600).

Após atingir a absorbância desejada, cada cultura foi dividida em duas alíquotas: uma para controle sem adição de IPTG e outra com adição de IPTG em concentrações finais de 1,0 mmol/L. Foram realizados testes para determinar melhor temperatura e tempo de incubação para expressão da proteína. As temperaturas testadas foram de 30 °C e 37 °C com agitação de 200 rpm, e o tempo de incubação foram coletados em 0, 2 horas e 30 minutos, e 16 horas. Para avaliar a eficiência da expressão da proteína foram coletadas frações de 1 ml em cada temperatura e tempo de incubação. Posteriormente, estas frações foram submetidas a leituras de absorbância (A600) e centrifugadas (16.000 x g por 2 minutos), descartando-se a solução sobrenadante e ressuspendendo-se o precipitado (*pellet*) em 100 µL de tampão de amostra SDS 1x (12 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glicerol; 0,4% sódio dodecil-sulfato; 2,88 mmol/L 2-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol). O volume

contendo o *pellet* ressuspendido foi então aquecido a 100 °C por 5 minutos e resfriado em seguida no gelo. Para a avaliação dos resultados após os experimentos de expressão foram realizados ensaios de eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3.2.10.2 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE

Os ensaios de eletroforese SDS-PAGE foram executados com gel de separação de 12,5% e com o emprego do sistema vertical *Mini-Protean® II* (*Bio-Rad®*) seguindo as orientações do fabricante, aplicando-se 80 a 100 V por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos. Ao término dos experimentos, os géis foram retirados e corados com solução de azul de Coomassie.

Como controles negativos, foram utilizadas colônias de *E. coli* BL21 (DE3) sem o plasmídeo de expressão (indicado com a letra C), e colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo sem o inserto para produção da proteína Cap em questão (indicado com a letra P). Ambos os controles também foram submetidos a variações das condições, assim como as bactérias transformadas com o plasmídeo contendo a sequência de interesse. O produto esperado para os experimentos seria uma banda proteica de aproximadamente 23 kDa.

3.2.11 Estudos da presença de mRNA para expressão da proteína Cap do PCV2b-w

3.2.11.1 Indução em diferentes tempos e concentrações de IPTG para obtenção de RNA

Para verificação da presença do mRNA correspondente à proteína Cap do PCV2b-w foram realizados experimentos de indução para expressão da proteína recombinante utilizando a linhagem BL21(DE3) de *E. coli* (após reação de transformação com o plasmídeo recombinante pET28a(+)-Cap), verificando-se as condições mais apropriadas de temperatura, concentração de agente indutor (IPTG) e tempo de indução. A propagação das bactérias foi feita a partir da solução de estoque mantida a -80 °C com plaqueamento em meio LB ágar contendo antibiótico canamicina (30 µg/mL) e cultivo a 37 °C por 16 horas

(*overnight*). Em seguida, foram coletadas colônias isoladas dessas placas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico canamicina em concentração de 30 µg/mL. Procedeu-se então à incubação a 37 °C por 16 horas (*overnight*) sob agitação de 200rpm. O controle negativo foi realizado com uma colônia de *E. coli* BL21 (DE3) na ausência do plasmídeo de expressão. Uma fração de 1 mL de cada cultura foi transferida para 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, e incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm, até atingir absorbância entre 0,5 e 1,0 no comprimento de onda de 600 nm (A600). Para tanto, foram coletadas alíquotas de 500 µL da amostra para leitura no espectrofotômetro em tempos de incubação diferentes. Após atingir a absorbância desejada, cada cultura foi dividida em duas alíquotas: uma para controle sem indução e outra induzida com IPTG em concentrações finais de 0,5 e 1,0 mmol/L (incubadas a 30 °C, com agitação de 200 rpm). O efeito do tempo de indução também foi avaliado, considerando os momentos 0, 30 minutos, 1 hora e 4 horas após a adição de IPTG.

Para os procedimentos subsequentes de extração de RNA, frações de 1 mL correspondentes às condições experimentais testadas foram centrifugadas (16.000 x g por 2 minutos), com descarte da solução sobrenadante e armazenamento dos *pellets* obtidos a -80° C.

3.2.11.2 Extração de RNA

Os *pellets* armazenados a -80°C foram ressuspensos em 300 µL de NaCl 0,9%, e a extração de RNA foi realizada com kit de extração *MagaZorb® Total RNA Mini-Prep Kit (Promega®)*, de acordo com as orientações do fabricante. O produto extraído foi submetido a diluições seriadas de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 para posterior tratamento com DNase (para clivagem do DNA genômico) e reação de síntese de cDNA.

3.2.11.3 Tratamento com a DNase

O tratamento com DNase foi realizado com a enzima *RQ1 RNase-Free DNase (Promega®)* de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados

6 μL da amostra de RNA extraído, 3 μL da enzima, 1 μL de tampão do kit. A reação foi interrompida pela adição de 3 μL de *Stop Solution* (solução do kit) e a solução resultante foi mantida resfriada em gelo para o próximo passo.

3.2.11.4 Síntese de cDNA

O RNA total extraído e tratado com DNase foi então submetido a reação para síntese de cDNA com o *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit* (*New England's BioLabs®*), seguindo-se protocolo do fabricante. A 6 μL da solução obtida no procedimento anterior (item 3.211.3) foram adicionados 2 μL de *Random Prime Mix* (60 μM) e o volume total resultante foi incubado a 65 °C por 5 minutos sendo, logo em seguida, mantido em gelo. Em seguida, foram adicionados aos microtubos mais 10 μL da *ProtoScript® II Reaction Mix* (2x) e 2 μL *ProtoScript® II Enzyme Mix* (10x), obtendo-se um volume final de 20 μL , que foram incubados em três condições diferentes: a 25 °C por 5 minutos, a 42 °C por 60 minutos e a 80 °C por 5 minutos (condição de reação de acordo com o fabricante). Para o controle da reação de tratamento com DNase foi realizado o mesmo procedimento da reação de síntese de cDNA, porém a enzima *ProtoScript® II Enzyme Mix* (10x) foi substituída nas amostras por água livre de nuclease. Os produtos finais obtidos pelos procedimentos descritos foram submetidos a PCRs para amplificação da sequência desejada e a ensaios de eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualização dos resultados.

3.2.11.5 Amplificação por PCR

As sequências de cDNA para analisar a presença de mRNA correspondente à proteína Cap do PCV2b-w foram obtidas por amplificação pela PCR. Os *primers* utilizados para a amplificação foram PCV0-R (GGC ATA TGG TAT ACG GAT CCT TAC GGA TTC A) e PCV0-F2 (TAC CCC ATG GGT CAC CAC CAC CAC CAC CAC ATG ACC TAT CCG CGT) adquiridos junto à empresa *Invitrogen®*. As reações foram realizadas com a enzima *GoTaq® Green Master Mix* (*Promega®*) para um volume de reação de 25 μL , conforme orientações do fabricante. As amostras foram submetidas ao seguinte ciclo de

amplificação: 94 °C para a desnaturação térmica inicial (10 minutos), seguida de 40 ciclos de desnaturação das fitas de DNA 94 °C (60s), anelamento dos *primers* a 55 °C (60s) e extensão a 72 °C (60s). Para a extensão final das fitas foi aplicada uma temperatura de 72 °C por 5 minutos e a amostra foi mantida a 22 °C até ser retirada do termociclador.

3.2.11.6 Análise do produto amplificado

Uma alíquota de 5 µL dos produtos amplificados resultantes da PCR foi analisada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®)* seguindo as instruções do fabricante. Para a realização do ensaio eletroforético foram aplicados 80 V por 30 minutos e o marcador molecular utilizado foi o *LowRanger® 100bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp®)* conforme orientação do fabricante.

3.2.12 Estudos de indução com diferentes concentrações de IPTG para expressão da proteína Cap do PCV2b-w e ensaios de Western Blot

Paralelamente à coleta de amostras para extração de RNA, já descritas anteriormente, também foram coletadas frações das amostras com tempo de indução de 4 horas e concentrações de IPTG de 0, 0,5 e 1,0 mmol/L para a realização de ensaios de eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot*.

3.2.12.1 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE

As alíquotas foram centrifugadas por 2 minutos (16.000 x g), descartando-se o sobrenadante. O precipitado (*pellet*) foi ressuspenso em 100 µL de tampão de amostra SDS 1x (12 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glicerol; 0,4% sódio dodecil-sulfato; 2,88 mmol/L 2-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol). O volume resultante foi aquecido a 100 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriado e mantido em gelo. Para a comparação dos resultados após a expressão foram realizados ensaios de eletroforese SDS-PAGE (Laemmli,

1970) em gel de separação de 12,5%. Os ensaios eletroforéticos foram conduzidos com o sistema vertical *Mini-Protean® II* (*Bio-Rad®*) aplicando-se 80 a 100 V por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos, seguindo as recomendações do fabricante. Ao término do procedimento os géis foram retirados, sendo um deles corado com solução de azul de Coomassie e o outro utilizado para os ensaios de *Western Blot*

3.2.12.2 Ensaio de Western Blot

Após os ensaios de eletroforese SDS-PAGE as bandas de proteínas obtidas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (porosidade 0,22 µm – *Protean®* – *Whatman®*) por intermédio do aparelho *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell®* (*Bio-Rad®*) (12 V por um período de 1 hora e 30 minutos) seguindo as recomendações do fabricante. Estes experimentos foram executados com tampão de transferência Bjerrum & Schafer-Nielsen (48 mM tris-HCl, 39 mM glicina, 20% metanol, 1,3 mM SDS (0,0375%), pH 9,2). Após as transferências para a membrana de nitrocelulose, o gel de eletroforese foi corado com solução de azul de Coomassie para verificação da eficiência do processo. As membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S (0,1% Ponceau, 5% ácido acético glacial) por um período de 10 minutos. Os segmentos da membrana de nitrocelulose contendo as bandas proteicas transferidas foram recortadas em tiras e lavadas em água Milli-Q. Em seguida, as tiras foram bloqueadas com solução de TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) contendo LPD (leite em pó desnatado) a 10% (m/v) por 16 horas, sob agitação e em temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram provenientes de soro suíno contendo IgG anti-PCV2 (diluição 1:100) (anticorpo primário) e do conjugado anti-Pig IgG (A5670 – *SIGMA-ALDRICH*) (diluição 1:500) (anticorpo secundário). O anticorpo primário foi diluído em TBS contendo LPD 10% (m/v) e as fitas de nitrocelulose foram incubadas nesta solução por 2 horas, sob agitação em temperatura ambiente. Após duas lavagens em TBS por 10 minutos, foi adicionado o conjugado marcado com peroxidase diluído em TBS contendo 10% de LPD. As tiras foram incubadas novamente por 2 horas, sob agitação. A revelação da membrana de

nitrocelulose foi realizada com solução de substrato cromógeno (50 mL de TBS, 10 mL de metanol, 1 mL de 4-cloro-1-naftol a 30 mg/mL (diluído em metanol) e 30 µL de solução de peróxido de hidrogênio a 30%) com incubação de 30 minutos sob agitação suave em temperatura ambiente. A reação enzimática foi bloqueada após três lavagens com água Milli Q, de 10 minutos cada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos estruturais *in silico*

4.1.1 Alinhamento múltiplo de sequências da proteína Cap e modelagem de uma porção do capsídeo do PCV2b-mut3

A análise do alinhamento múltiplo gerado com as sequências únicas de proteínas Cap do PCV2 mostrou que os resíduos M72, N77 e T200 são muito mais frequentes no circovírus suíno do que os resíduos encontrados nestas posições nos vírus PCV2b-mut1 (I200), PCV2b-mut2 (72I e 200I) e PCV2b-mut3 (I72, D77 e I200). Esta comparação destacou a rara ocorrência das mutações M72I e T200I, que são encontradas, respectivamente, em 0,4% (sete sequências) e 1,1% (17 sequências) do total de sequências únicas alinhadas (1600 sequências). A frequência da mutação N77D também é relativamente baixa, ocorrendo em apenas 26,3% das sequências selecionadas (Tabela 1). Este achado por si só destaca a possível importância destas mutações para o marcado ECP dos vírus PCV2b-mut 2 e PCV2b-mut3, que são capazes de promover a morte de células testiculares suínas (células ST) logo após a segunda passagem de cultivo (Cruz *et al.*, artigo submetido para publicação).

Além disso, como atestado pela análise das sequências utilizadas no alinhamento múltiplo, a combinação das três mutações em questão é encontrada somente no PCV2b-mut3, que apresentou ECP mais intenso que o PCV2b-mu2. Assim, os achados de Cruz *et al.* (artigo submetido para publicação) e a comparação entre as sequências selecionadas sugerem que o claro incremento do ECP *in vitro* provocado pelo acúmulo sequencial das mutações pode estar relacionado a alterações estruturais/funcionais da proteína Cap.

| Mutações | | Frequência (%) | Nº de sequências | Aminoácido |
|----------|-------|----------------|------------------|-----------------|
| 1 | M72I | M = 88,1 % | 1.410 | Metionina |
| | | L = 11,0% | 176 | Leucina |
| | | I = 0,44 % | 7 | Isoleucina |
| | | V = 0,19 % | 3 | Valina |
| | | T = 0,1 % | 2 | Treonina |
| | | R = 0,06 % | 1 | Arginina |
| | | W = 0,06 % | 1 | Triptofano |
| 2 | N77D | N = 73,0 % | 1.164 | Asparagina |
| | | D = 26,3 % | 420 | Ácido Aspártico |
| | | G = 0,8 % | 13 | Glicina |
| | | E = 0,06 % | 1 | Ácido Glutâmico |
| | | K = 0,06 % | 1 | Lisina |
| | | T = 0,06 % | 1 | Treonina |
| 3 | T200I | T = 98,0 % | 1.568 | Treonina |
| | | I = 1,0 % | 17 | Isoleucina |
| | | A = 0,5 % | 9 | Alanina |
| | | H = 0,3 % | 5 | Histidina |
| | | S = 0,06 % | 1 | Serina |

Tabela 1. Frequências dos aminoácidos encontradas nas posições 72, 77 e 200 de 1600 sequências únicas de proteínas Cap do PCV2 alinhadas por meio da ferramenta de alinhamento múltiplo *MUSCLE* (Edgar, 2004).

A possível ocorrência de tais alterações na proteína Cap é reforçada pelas características das mutações observadas, uma vez que os novos resíduos apresentam propriedades físico-químicas diferentes em relação aos resíduos M72, N77 e T200. As alterações das propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos mutados no três vírus foram as seguintes: i) no PCV2b-mut1, um resíduo polar não-carregado (treonina) é substituído por um resíduo apolar alifático (isoleucina) (Figura 1A), ii) no PCV2b-mut2 a mutação anterior é acompanhada pela mutação M72I, onde um resíduo hidrofóbico com

uma cadeia alifática linear e um grupo nucleofílico tioéster (metionina) é repostado por um resíduo hidrofóbico de cadeia alifática ramificada (isoleucina) (Figura 1B) e iii) no PCV2b-mut3 as duas mutações anteriores tiveram a adição da mutação N77D, caracterizada pela troca de um resíduo polar não carregado (asparagina) por outro negativamente carregado (aspartato) (Figura 1C).

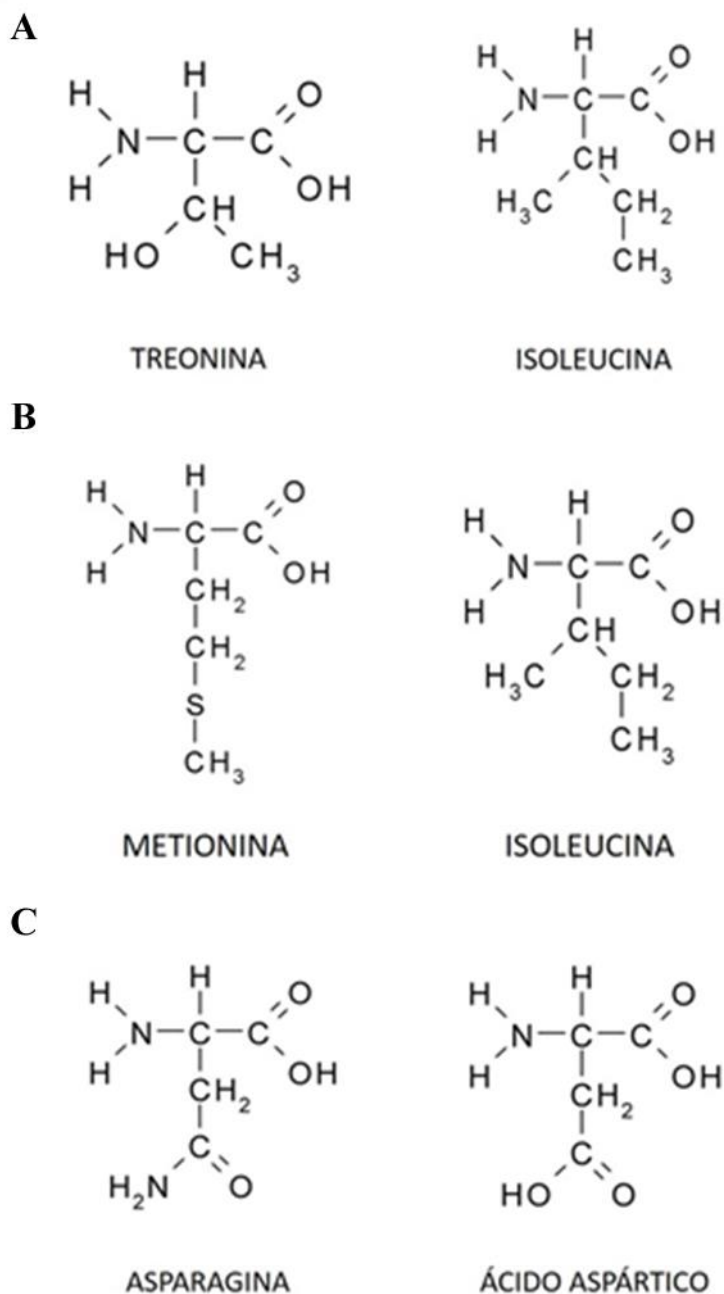


Figura 1. Mutações encontradas nas proteínas Cap dos vírus PCV2b-mut1 (**A:** T200I), PCV2b-mut 2 (**A:** T200I e **B:** M72I) e PCV2b-mut3 (**A:** T200I, **B:** M72I e **C:** N77D).

Além da baixa frequência das alterações observadas e das alterações físico-químicas mencionadas, outro fato interessante chama a atenção para a importância das mutações em questão: dois de seis epítopos identificados por Mahé *et al.* (2000) contém em suas sequências os resíduos M72, N77 e T200. Por sua vez, Khayat *et al.* (2011) mapearam, com base em um modelo cristalográfico do capsídeo obtido a partir de uma proteína Cap recombinante, a posição destes seis epítopos, destacando que aqueles que continham os resíduos M72, N77 e T200 estavam localizados na superfície viral. Estes autores ainda inferiram que os resíduos uma série de resíduos, que inclui o M72, N77 e T200, são provavelmente responsáveis pelo reconhecimento diferencial de anticorpos monoclonais produzidos especificamente contra o PCV1 e o PCV2. Desta forma, segundo os autores, estes três resíduos fazem parte de epítopos exclusivamente encontrados no PCV2 e que, portanto, são importantes para o desenvolvimento de vacinas destinadas ao controle da circovirose suína.

Com base nos dados acima, foi realizada também a modelagem de uma porção do capsídeo viral contendo nove moléculas da proteína Cap do PCV2b-mut3e com o intuito de obter-se mais informações estruturais relacionadas às mutações M72I, N77D e T200I. Neste modelo podem ser observados três monômeros centrais e mais seis cadeias polipeptídicas, adicionadas para prover contatos de interface para todos os componentes da tríade central. O modelo com nove cadeias polipeptídicas e um monômero da proteína Cap do PCV2b-mut3 Cap são mostrados, respectivamente, nas Figuras 2 e 3. O modelo monomérico da proteína Cap do PCV2b-mut3 apresentou, assim como seu correspondente cristalográfico, um *fold* do tipo *jelly roll*, que é caracterizado pela presença de duas folhas β compostas, cada uma, por quatro fitas antiparalelas. Este tipo de *fold* foi descrito pela primeira vez na proteína do capsídeo do vírus TBSV (*Tomato Bushy Stunt Virus*) (Harrison *et al.*, 1978) e depois observado em outros vírus icosaédricos (Speir & Johnson, 2008). Na estrutura nonamérica, como esperado, foi possível observar que os contatos entre as subunidades ocorreram principalmente entre os *loops* de cada uma das proteínas Cap. A qualidade estrutural do modelo como um todo, por sua vez, foi considerada satisfatória, como mostrado pelo programa *MolProbity* (Chen *et al.*, 2010): 98,8% de todos os resíduos encontravam-se alocados nas

regiões energeticamente favoráveis do diagrama de Ramachandran. Adicionalmente, o modelo apresentou um valor adequado para o *MolProbity score* (1,31), que leva em conta parâmetros estruturais como a ocorrência de *clashes* (proximidade inadequada entre átomos) e a qualidade estereoquímica global (Chen *et al.*, 2010). A análise estrutural pelo servidor *ProSA-web* (Wiederstein & Sippl, 2007) também indicou um valor adequado para o *Z-score* (-4,47), um indicador da qualidade geométrica que compara o modelo com outras estruturas experimentais de peso molecular similar depositadas *Protein Data Bank* (PDB). O alinhamento estrutural entre os C^α das nove cadeias do modelo nonamérico e aqueles de uma subunidade do modelo cristalográfico proposto por Khayat *et al.* (2011) também demonstrou a similaridade entre as cadeias polipeptídicas, visto que o RMSD calculado foi de 1,0 Å.



Figura 2. Representação em *cartoon* Monômero da proteína Cap do PCV2b-mut3. O *fold* do tipo *jelly roll* é caracterizado pela presença de duas folhas β (em púrpura) compostas, cada uma, por quatro fitas antiparalelas. Ilustração gerada pelo programa *PyMOL*® v.1.3.

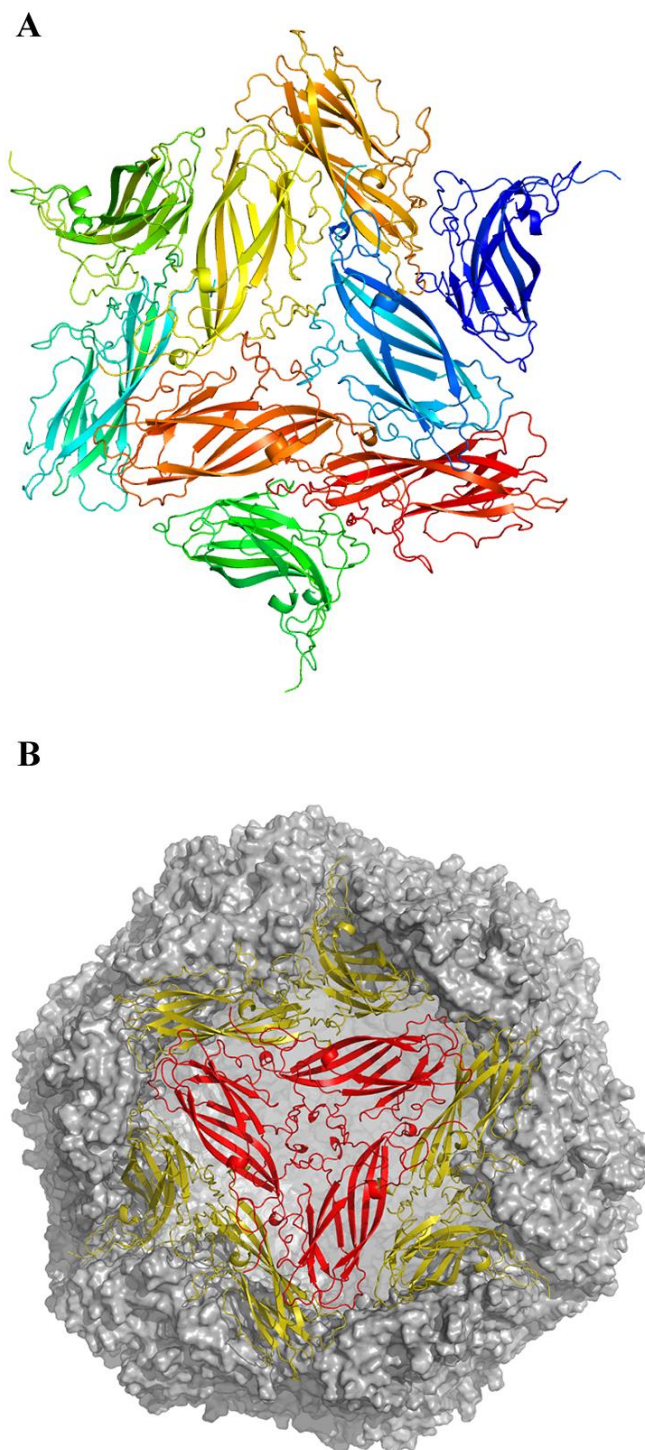


Figura 3. Modelo nonamérico de parte do capsídeo do PCV2b-mut3. **(A)** Representação em *cartoon* das nove cadeias polipeptídicas da proteína Cap (destacadas em cores diferentes). **(B)** Representação em *cartoon* das nove cadeias polipeptídicas da proteína Cap mostradas em (A) no capsídeo completo do PCV2-mut3. A tríade central é destacada em vermelho e os demais monômeros em amarelo. Ilustração gerada pelo programa *PyMOL*® v.1.3.

4.1.2 Localização das mutações pode influenciar a eficiência da infecção viral

Como mostrado na Figura 4, os resíduos mutados 72I, 77D e 200I do PCV2b-mut3 encontram-se claramente localizados em posições próximas e acessíveis ao solvente na superfície do modelo nonamérico. Este achado evoca algumas questões referentes às possíveis alterações estruturais/funcionais decorrentes das mutações, como, por exemplo, o papel dos novos resíduos no reconhecimento das células-alvo do vírus.

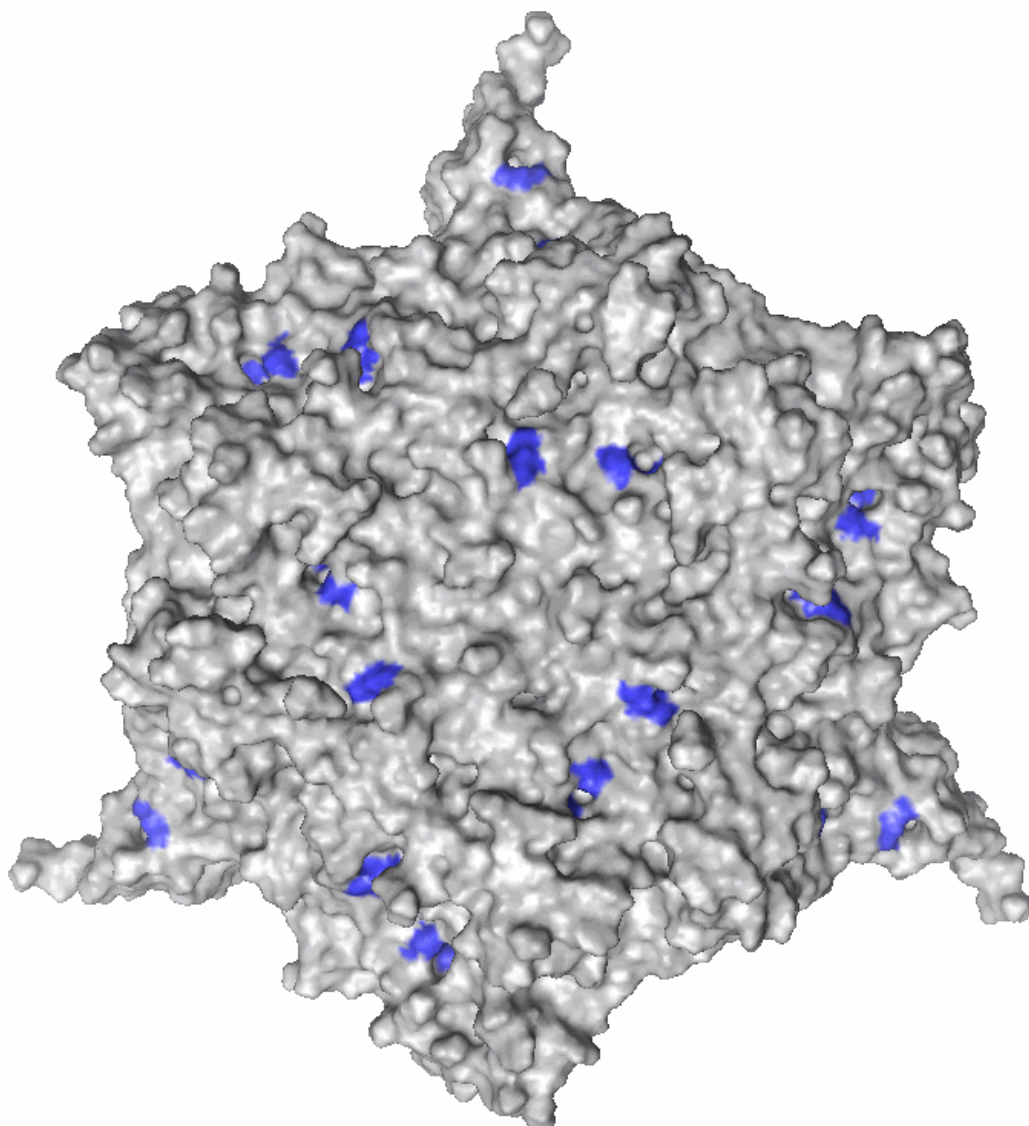


Figura 4. Localização das mutações M72I, N77D e T200I na superfície do modelo nonamérico de parte do capsídeo do PCV2b-mut3. Ilustração gerada pelo programa *PyMOL*® v.1.3.

Como previamente descrito por Misinzo *et al.* (2006), a adsorção do PCV2 nas células hospedeiras é um evento determinante para a infecção viral e pode estar diretamente relacionada a um mecanismo de tropismo celular e patogênese. Estes mesmos autores investigaram o papel de glicosaminoglicanos (GAGs) como receptores celulares do PCV2 com base em dois princípios: i) os GAGs são importantes receptores celulares para muitos outros tipos de vírus (Bernfield *et al.*, 1999; Liu & Thorp, 2002; Rostand & Esko, 1997; Vanderplasschen *et al.*, 1993), e ii) muitos tipos diferentes de células estão implicadas na infecção pelo PCV2, indicando, portanto, que estes vírus podem identificar um ou mais tipos ubíquos de receptores celulares. Os resultados do trabalho de Misinzo *et al.* (2006) mostraram que a pré-incubação do PCV2 com sulfato de heparina, heparan sulfato e sulfato de condroitina B (tipos diferentes de GAGs encontrados na superfície de diferentes células) foi capaz de reduzir a infecção de células suínas monocíticas 3D4/31, possivelmente pela competição com receptores celulares similares presentes nas células testadas. Assim, estes autores puderam destacar a importância de três moléculas específicas (sulfato de heparina, heparan sulfato e sulfato de condroitina B) para os mecanismos de infecção do PCV2, visto que outros GAGs não evitaram a invasão viral nas células 3D4/31. Portanto, em associação às mudanças das propriedades físico-químicas e ao reconhecido papel dos resíduos M72, N77 e T200 na resposta humoral contra o PCV2 já mencionados acima, o posicionamento das mutações M72I, N77D e T200I na superfície viral também pode estar relacionado ao reconhecimento diferencial de receptores celulares. Esta adaptação poderia aumentar a afinidade por receptores já utilizados pelo vírus e/ou mesmo permitir o reconhecimento de novas moléculas. Este possível efeito é justificado pelo fato de que a compensação entálpica/entrópica derivada da interação entre moléculas é baseada em diversos fatores, incluindo a flexibilidade do sítio de ligação e suas regiões vizinhas (Breiten *et al.*, 2013; Chodera & Mobley, 2013; Dunitz, 1995; Gilli *et al.*, 1994; Qian, 1998; Ryde, 2014). Assim, ambos os fenômenos (aumento da afinidade por receptores e/ou reconhecimento de novas moléculas na superfície celular) poderiam aumentar a capacidade de invasão celular dos vírus mutantes e explicar o destacado ECP apresentado pelo PCV2b-mut2 e PCVb-mut3 *in vitro*. Outra observação que reforça esta possibilidade diz

respeito ao fato de que os resíduos mutados encontrados no PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 estão localizados no interior ou na borda de cavidades (*pockets*) localizadas no lado externo do modelo nonamérico. Como enfatizado por Gao & Skolnick (2012), estas regiões apresentam formato côncavo e caracterizam-se por ser pontos de reconhecimento/ancoragem de ligantes na superfície de proteínas. De forma bastante sugestiva, os resíduos de metionina e treonina das posições 72 e 200 são substituídos por duas isoleucinas na borda e no interior de um *pocket* (aqui denominado *pocket 1*) nas superfícies das proteínas Cap do PCV2b-mut3 que fazem parte do modelo nonamérico.(Figura 5). Estas mutações tornam a região que contém o *pocket 1* notavelmente mais apolar e, conseqüentemente, quimicamente distinta em relação aos vírus que não possuem as mutações em questão. Da mesma forma, também foi notado que a mutação N77D ocupa uma área na região de borda de outro *pocket* da superfície do modelo (aqui denominado *pocket 2*). (Figura 5). Neste caso, o ambiente em torno do *pocket 2* tornou-se mais hidrofílico devido à substituição de um resíduo também ocorria substituição de um resíduo polar não carregado (asparagina) por outro negativamente carregado (aspartato).

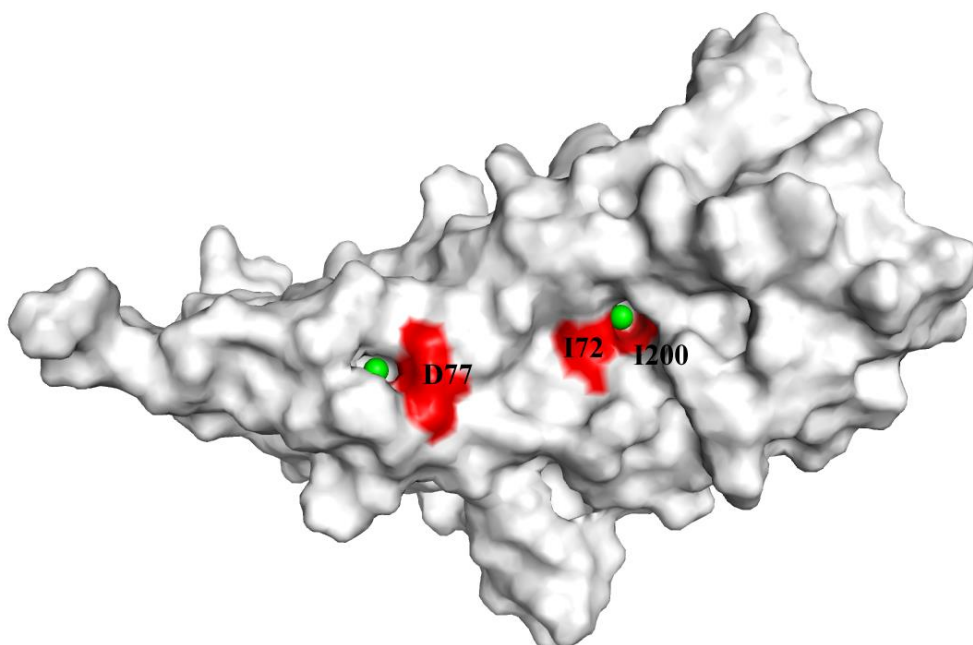


Figura 5. Localização das mutações M72I, N77D e T200I (em vermelho) na superfície de um monômero da proteína Cap do PCV2b-mut3. Os resíduos I72, D77 e I200 encontram no interior ou ao redor de *pockets* (indicados com esferas verdes). Ilustração gerada pelo programa PyMOL® v.1.3.

4.1.3 Mutações influenciam flexibilidade da proteína Cap do PCV2b-mut3

Uma questão estrutural bastante interessante a respeito do papel das mutações observadas no PCV2b é a influência destas alterações na flexibilidade da proteína Cap. É bem conhecido o papel da flexibilidade molecular nas inúmeras atividades conhecidas das proteínas. Neste sentido, o cálculo dos modos normais de vibração molecular de proteínas é muito útil para auxiliar a identificação de regiões e movimentos responsáveis pela funcionalidade das proteínas. Este tipo de cálculo é baseado na chamada análise dos componentes principais (*Principal Components Analysis* - PCA) (Jolliffe, 2002), um tipo de estudo que revela os modos coletivos de movimento, particularmente aqueles de baixa frequência, os quais estão mais relacionados com ao equilíbrio dinâmico e função biológica de uma dada molécula (Bahar *et al.*, 2010).

Assim, uma análise dos primeiros 20 modos normais de vibração molecular de um monômero da proteína Cap do vírus selvagem (PCV2b-w) e do vírus com as mutações M72I, N77D e T200I (PCV2b-mut3) foi executada para verificar a existência de eventuais diferenças de flexibilidade molecular (ver exemplos na Figura 6). A flutuação dos modos normais de vibração dos C^α das duas moléculas mostrou um padrão claramente distinto, mostrando ser possível a ocorrência de movimentos de baixa frequência distintos entre as proteínas Cap dos vírus PCV2b-w e PCV2b-mut3 (Figuras 7A e 7B). De acordo com os mapas de calor gerados, as maiores diferenças de flutuação entre os C^α das proteínas Cap analisadas são referentes aos primeiros dez modos normais de vibração molecular (7 a 16). A comparação destes modos evidencia a maior flexibilidade da proteína Cap do vírus PCV2b-w em relação ao PCV2b-mut3. O mapa de calor diferença entre os dois vírus (PCV2b-w - PCV2b-mut3) revela, ainda, as regiões de maior diferença de flexibilidade entre a proteína Cap selvagem e aquela com as mutações M72I, N77D e T200I (Figura 7C).

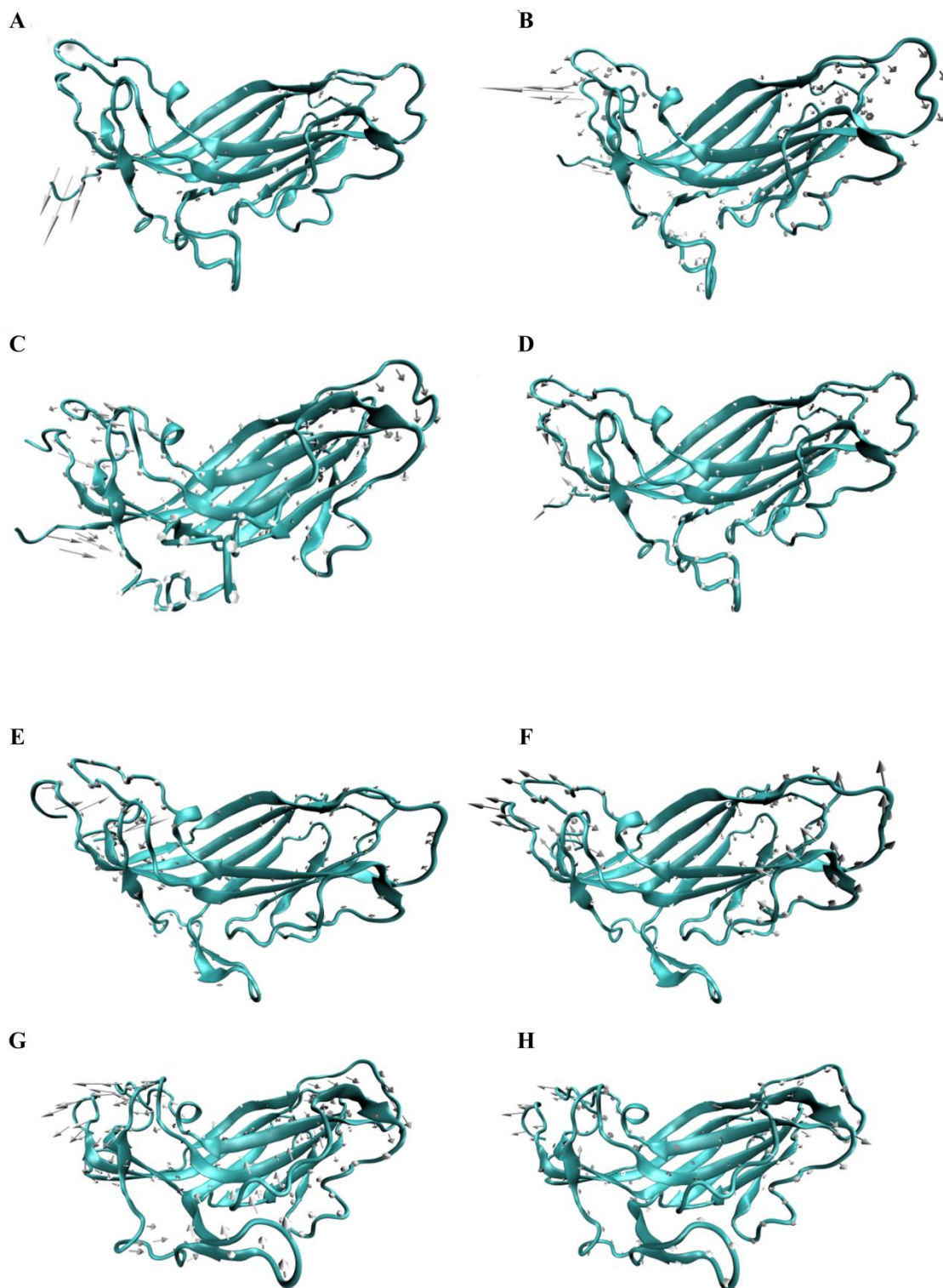


Figura 6. Exemplos de modos normais de vibração molecular calculados para os monômeros das proteínas Cap do PCV2b-w e PCV2b-mut3. De **(A)** a **(D)** são mostrados, respectivamente, os modos 7 a 10 calculados para a proteína Cap do PCV2b-w, enquanto que de **(E)** a **(H)** estão representados, respectivamente, os modos 7 a 10 calculados para a proteína Cap do PCV2b-mut3. As setas indicam a direção e amplitude dos movimentos calculados. Ilustração gerada pelo programa *VMD v.1.9.3*.

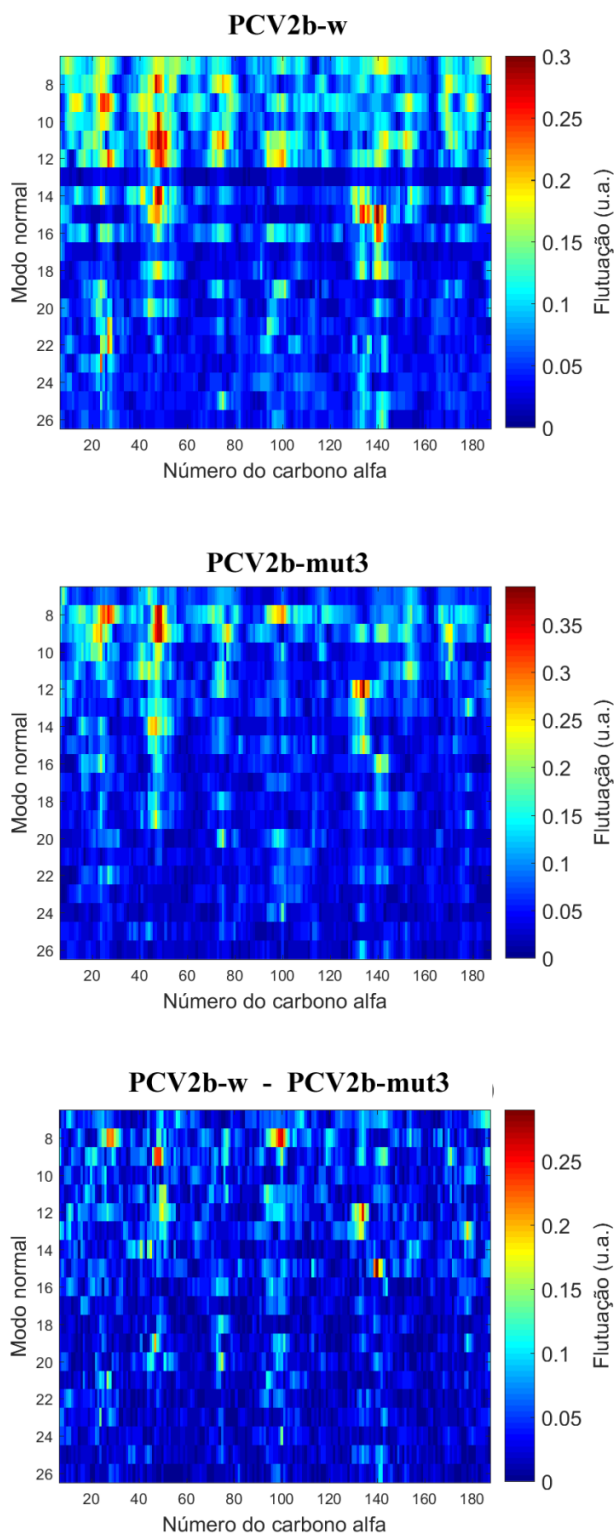


Figura 7. Flutuação dos modos normais de vibração molecular dos C^α das proteínas Cap do PCV2b-w **(A)**, PCV2b-mut3 **(B)** e a diferença entre (A) e (B) (PCV2b-w - PCV2b-mut3) **(C)**. Cinco regiões com diferenças significativas de flexibilidade são observadas nos modos 8 (resíduos 25-31 e 94-102), 9 (resíduos 46-50), 12 (resíduos 130-136) e 15 (resíduos 139-142). Os mapas de calor (*heatmaps*) foram gerados com o programa *MATLAB*[®] v.2016.

Neste mapa, observam-se, pelo menos, cinco regiões com diferenças significativas de flexibilidade nos modos 8 (resíduos 25-31 e 94-102), 9 (resíduos 46-50), 12 (resíduos 130-136) e 15 (resíduos 139-142). A localização destes resíduos na superfície do modelo nonamérico mostra que eles formam três regiões contínuas que, por sua vez, distribuem-se ao redor da tríade central (Figura 8). Estas três regiões "menos flexíveis" do PCV2b-mut3 fazem ainda contato com os epítomos de superfície mapeados por Khayat *et al.* (2011) que contém as mutações M72I, N77D e T200I (Figura 8).

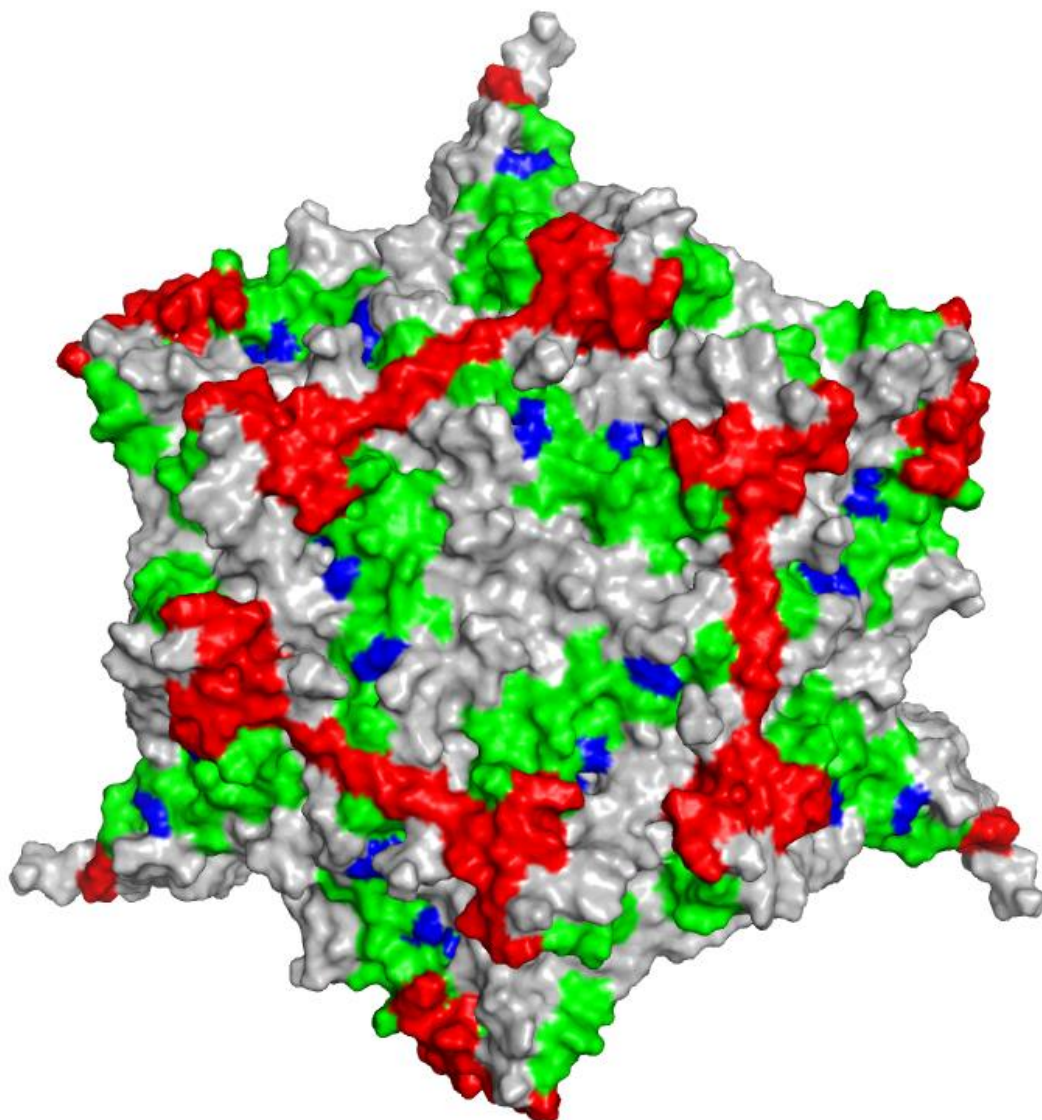


Figura 8. Localização das porções menos flexíveis (em vermelho) presentes na superfície do modelo nonamérico mostra que elas formam três regiões contínuas redor da tríade central. Estas regiões também fazem contato com os epítomos de superfície mapeados por Khayat *et al.* (2011) (em verde) e são próximas às mutações M72I, N77D e T200I (em azul). Ilustração gerada pelo programa PyMOL v.1.3.

Estas informações trazem à tona algumas especulações interessantes quanto à atividade patogênica e características imunogênicas dos vírus mutantes. A proximidade destas zonas mais rígidas em relação às posições mutadas pode, por exemplo, favorecer o reconhecimento de receptores celulares ao tornar os entornos desta região estruturalmente mais estáveis. Como discutido anteriormente, o aumento da afinidade por receptores celulares e/ou o reconhecimento de novas moléculas na superfície de células-alvo podem estar associados ao ECP causado pelo PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 *in vitro*. Por outro lado, a ocorrência de regiões mais flexíveis adjacentes a epítomos estruturais localizados na superfície do PCV2b-w levanta a possibilidade da ocorrência de falhas vacinais. Esta possibilidade é baseada no trabalho de Thorpe & Brooks III (2007), onde foram mostradas evidências que sustentam a existência de uma correlação entre a afinidade de anticorpos e a flexibilidade de antígenos. Assim, a diminuição da flexibilidade das regiões mencionadas (e sua possível influência nos epítomos estruturais adjacentes) associada à ocorrência de mutações pontuais de resíduos-chave envolvidos no reconhecimento de anticorpos anti-PCV2 (M72, N77 e T200) (Khayat *et al.*, 2011), podem tornam o PCV2b-mut3 e outros vírus mutantes resistentes à imunidade conferida por vacinas comerciais produzidas com variedades virais desprovidas das mutações M72I, N77D e T200I. Portanto, a possível emergência natural de vírus similares aos identificados *in vitro* por da Cruz *et al.* (artigo submetido para publicação) (especialmente no caso do PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3) pode representar uma potencial ameaça à indústria suinícola nacional e mundial.

4.2 Estudos de expressão da proteína Cap do PCV2b-w

4.2.1 Eletroforese SDS-PAGE após experimentos de expressão com células transformadas com o plasmídeo pET28a-PCV2

Variando-se condições como temperatura (30 °C e 37 °C) e tempo de indução (0, 2:30 h e 16 h). De modo geral, a concentração ideal de agente indutor (IPTG) foi de 1,0 mmol/L. Alguns parâmetros foram ajustados durante os experimentos para tentativas de uma melhor expressão.

Segundo os autores Gopal & Kumar (2013), a solubilidade é um fator que pode dificultar a expressão de proteínas. A secreção no periplasma oferece um ambiente mais oxidativo do que o citosol, sendo possível que esses fatores reduzam ou aumentem a demanda de proteínas heterólogas solúveis. Os autores alegam que o problema da solubilidade é um pré-requisito para estudos estruturais, funcionais e bioquímicos de uma proteína e afirmam que não há uma estratégia universal para resolver este problema. Algumas das estratégias sugeridas por Gopal & Kumar (2013) para o aumento da solubilidade de proteínas recombinantes é a variação de fatores como, por exemplo, concentração do agente indutor de expressão e temperatura, bem como tempo de indução. Estes fatores foram explorados em nossos experimentos, contudo os resultados obtidos não mostraram variações claras, evidenciando que estes fatores provavelmente também não são a causa determinante do problema da expressão proteica.

A Figura 9 apresenta os resultados das análises de SDS-PAGE com variação de alguns parâmetros.

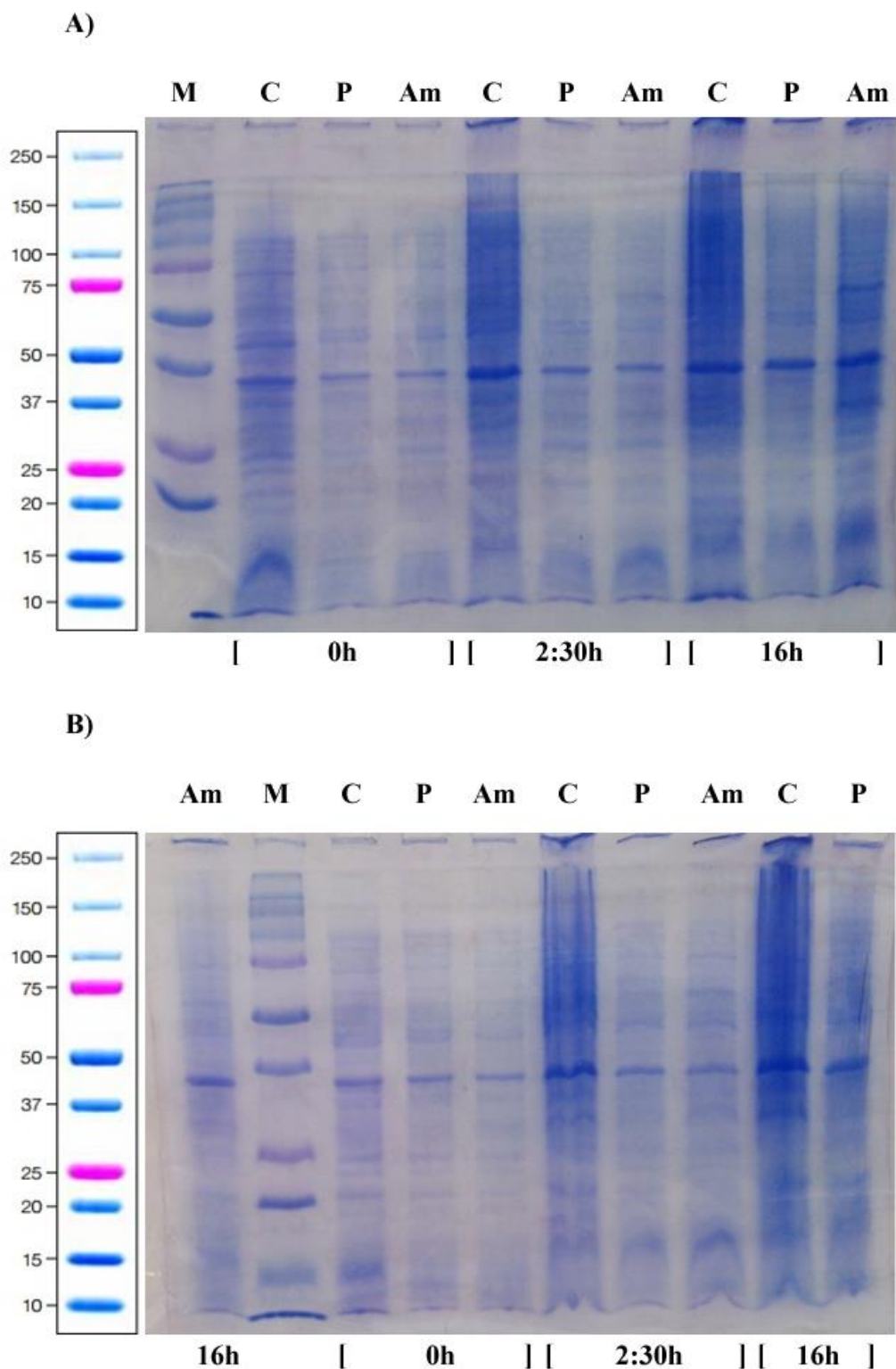


Figura 9. Ensaio de SDS-PAGE para expressão com células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a-Cap. **(A)** T = 30 °C e **(B)** T = 37 °C. **Colunas:** **(M)** Marcador *Precision Plus Protein*[®] (Bio-Rad[®]). **(C)** Controles negativos: *E.coli* BL21(DE3); **(P)** Controles negativos: *E.coli* BL21(DE3) + pET28a(+); **(Am)** *E. coli* BL21(DE3) + pET28a-Cap. **[IPTG] = 1,0 mmol/L; tempos de indução=0, 2:30 e 16 horas.**

Esses resultados mostram que, mesmo com as sugestões propostas na literatura, as variações de temperatura e tempo de indução não foram suficientes para melhorar a expressão de proteínas heterólogas. Segundo Inouye (1991), a variação no comportamento para a proteína heteróloga pode ser influenciada pelo ambiente onde a proteína será expressa, como o meio oxidativo do periplasma ou a participação de chaperonas homólogas ou heterólogas. Seguindo os pontos levantados por diferentes autores, podemos discutir as diferentes estratégias adotadas neste trabalho. Uma sugestão para melhorar a expressão de proteínas em sistemas recombinantes é a inserção na região N- ou C-terminal de uma glutationa-S-transferase (GST) (Smith D B. 1992, EP 0293249). Porém, experimentos anteriores executados por nossa equipe (com o plasmídeo pGS-21a), mostraram que a adição da GST não foi capaz de produzir resultados satisfatórios. Essa proteína fusionada foi então retirada do inserto antes da execução dos trabalhos envolvendo a subclonagem no novo vetor, o pET28a(+). Como demonstrado em nossos resultados, mesmo a ausência da GST não promoveu uma expressão significativa da proteína Cap.

Como observado nas Figuras 9 A e B, que são representativas de uma série de experimentos executados e condições testadas, mesmo um tempo de indução prolongado (16 horas) não foi adequado para a expressão da proteína de interesse, já que não foi possível a obtenção de bandas protéicas bem definidas com o peso molecular desejado. Estes resultados, somados a outros já obtidos anteriormente, suscitaram dúvidas quanto à ocorrência dos passos necessários à expressão da proteína Cap em *E. coli* utilizadas nos experimentos. Desta forma, foram executados experimentos para verificar a ocorrência ou não do processo de transcrição da sequência correspondente à proteína Cap mRNA inserida no plasmídeo de expressão.

4.2.2 Experimentos para detecção de mRNA correspondente à sequência da proteína Cap do PCV2b-w nas células de E. coli transformadas com o vetor de expressão

Foram detectadas bandas de cDNA com a massa molecular esperada (700pb), o que denota que a transcrição do inserto de interesse estava sendo realizada nas células bacterianas transformadas com o plasmídeo para expressão da proteína Cap do PCV2b-w.



Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% para detecção de cDNA após extração de RNA total das células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pET28a-PCV2. **Amostras 1 a 16:** tratadas com DNase e submetidas à síntese de cDNA. **Amostras 17 a 32** mesmas amostras anteriores, porém sem a utilização da enzima na reação de cDNA (reação controle). **M:** marcador *LowRanger*[®] 100bp DNA Ladder (NorgenBiotekCorp.[®]). As 4 amostras e suas diluições, em diferentes tempo de indução e concentração de IPTG. As amostras com 30 minutos de indução: **1, 2, 3 e 4 com 0,5 mmol/L de IPTG** (diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente) e **5, 6, 7 e 8 com 1,0 mmol/L de IPTG** (diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente). Amostras com 1 hora de indução: **9, 10, 11 e 12 sem IPTG** (diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente) e **13, 14, 15 e 16 com 0,5 mmol/L de IPTG** (diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000, respectivamente).

Este resultado confirma a presença de mRNA nas amostras de indução realizadas para este teste de mRNA. Porém todos os outros experimentos de indução de expressão da proteína realizados anteriormente não obtiveram sucesso. Embora a *E. coli* seja um organismo adequado para a expressão de genes heterólogos devido à facilidade de manipulação e produção de proteínas

recombinantes, alguns pontos frequentes podem ser apontados na ineficiência para essa expressão, como problemas na tradução do mRNA, tradução incorreta, que pode alterar a codificação dos genes (Olins& Lee 1993) e dificultar a obtenção dos produtos de interesse.

4.2.3 Ensaio de eletroforese SDS-PAGE e Western Blot para diferentes tempos de indução e concentrações de IPTG

Os resultados da Figura 11 mostram a presença de uma banda proteica com massa molecular aproximada de 23 kDa, evidenciando a possível síntese da proteína de interesse.

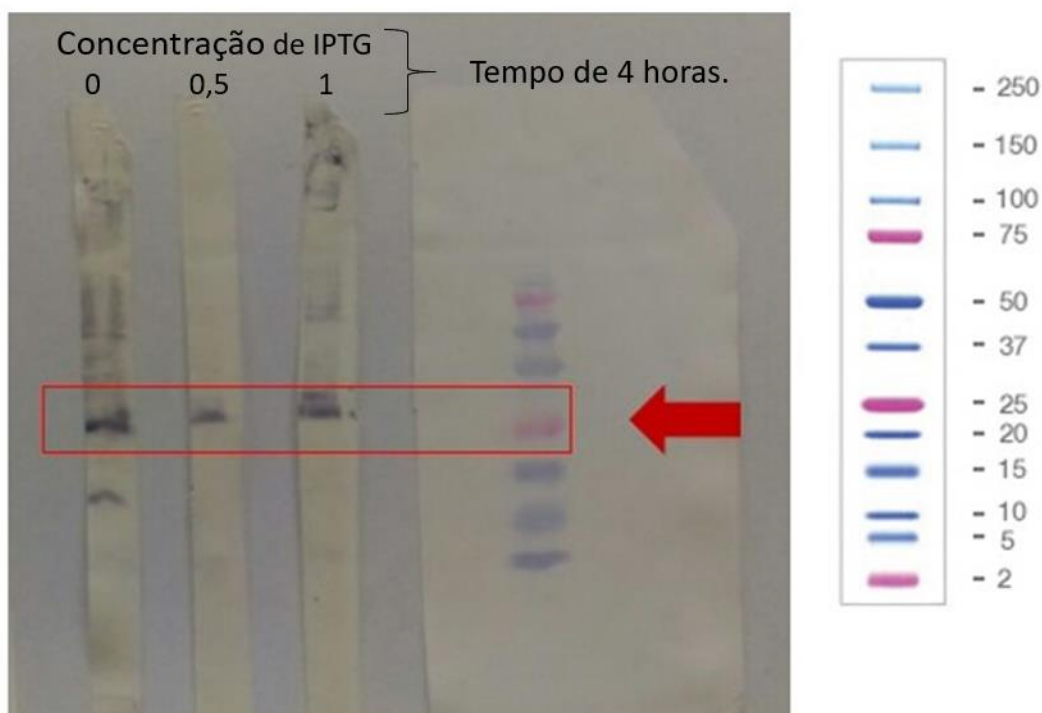


Figura 11. Ensaio de Western Blot para detecção da proteína cap do vírus PCV2b-w. Marcador *Precision Plus Protein® Dual Color Standards* (Bio-Rad®).

Podemos ressaltar que os códons do inserto presente nos vetores pET-28a(+) foram otimizados, o que deve ter evitado a ocorrência de problemas na síntese de tRNAs correspondentes e no processo de transcrição, como evidenciado pelos resultados da análise de expressão de mRNA. Porém, a

produção do mRNA de interesse pode ter sido aquém do necessário, o que explicaria os resultados obtidos nos ensaios de *Western Blot*.

Por fim, podemos ressaltar que outras alterações sugeridas na literatura também foram testadas pela nossa equipe em experimentos anteriores. A alteração do vetor de expressão e utilização de diferentes linhagens de *E. coli*, sugeridos por Gopal & Kumar (2013) como possíveis fatores que podem afetar a solubilidade e expressão de proteínas recombinantes, foram realizadas em estudos anteriores promovidos pela nossa equipe, nos quais o vetor pGS-21a foi inserido em células das linhagens Rosetta e BL21 (DE3) de *E. coli* submetidas posteriormente a experimentos de expressão com diferentes temperaturas, concentrações de agente indutor (IPTG), e tempo. Em nossos experimentos recentes, utilizamos a linhagem BL21 (DE3) com diferentes temperaturas e concentrações de IPTG visto que os resultados dos experimentos anteriores não demonstraram diferenças de expressão entre as linhagens mencionadas. Com base em todo o exposto, podemos concluir que os procedimentos experimentais para a produção de proteína Cap devem ser revistos, incluindo a mudança do sistema de expressão heteróloga.

5. CONCLUSÃO

Os trabalhos executados neste projeto concentraram-se em duas frentes: i) o estudo estrutural *in silico* envolvendo as proteínas Cap dos vírus PCV2b-w, PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 (Cruz *et al.*, artigo submetido para publicação) e ii) a realização de ensaios de expressão heteróloga da proteína Cap do PCV2b-w com vistas à produção futura desta e das demais proteínas para a realização de outros procedimentos baseados em técnicas biofísicas estruturais, como, por exemplo, ensaios de cristalização e experimentos de difração de raios X.

Em relação aos trabalhos referentes ao estudo estrutural *in silico* foi possível concluir que:

1) As mutações M72I, N77D e T200I presentes na proteína Cap dos vírus PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 apresentam uma frequência baixa, com base em um conjunto de 1600 sequências únicas depositadas em bancos de dados. O alinhamento múltiplo destas sequências indicou a baixa frequência das mutações M72I e T200I, que são encontradas, respectivamente, em 0,44 % (sete sequências) e 1,05 % (17 sequências) do total de sequências únicas alinhadas (1600 sequências). A frequência da mutação N77D também é relativamente baixa, ocorrendo em apenas 23,3 % das sequências selecionadas. A comparação realizada também destacou o caráter único do PCV2b-mut3, que foi o único vírus que apresentou a combinação das três mutações.

2) A análise das mutações (PCV2b-mut1: T200I; PCV2b-mut2: T220I e M72I; PCV2b-mut3: T200I, M72I e N77D) indicou uma clara diferença entre as propriedades físico-químicas dos novos resíduos de aminoácidos em relação àqueles substituídos. Estas alterações indicaram a possibilidade de alterações estruturais/funcionais relevantes das proteínas Cap dos vírus PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 em comparação com o PCV2b-w.

3) A estrutura do modelo contendo nove monômeros da proteína Cap do PCV2b-mut3 mostrou que os resíduos mutados 72I, 77D e 200I do PCV2b-mut3 encontram-se claramente localizados em posições próximas e acessíveis ao solvente na superfície da estrutura nonamérica modelo nonamérico. Este achado levanta algumas questões referentes às possíveis alterações estruturais/funcionais decorrentes das mutações, como, por exemplo, o papel dos novos resíduos no reconhecimento das células-alvo do vírus. Em associação às mudanças das propriedades físico-químicas, o posicionamento das mutações M72I, N77D e T200I na superfície viral pode formar um novo sítio de interação, permitindo o aumento da afinidade por receptores já utilizados pelo vírus e/ou mesmo permitir o reconhecimento de novas moléculas. Assim, ambos os fenômenos (aumento da afinidade por receptores e/ou reconhecimento de novas moléculas na superfície celular) poderiam aumentar a capacidade de invasão celular dos vírus mutantes e explicar o destacado ECP apresentado pelo PCV2b-mut2 e PCVb-mut3 *in vitro*. A possibilidade da ocorrência de reconhecimento diferencial de receptores celulares é reforçada pelo fato de que os resíduos mutados encontrados no PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 estão localizados no interior ou na borda de cavidades (*pockets*) localizadas no lado externo do modelo nonamérico.

4) A flutuação dos modos normais de vibração molecular dos C α dos monômeros das proteínas Cap do PCV2b-w e PCV2b-mut3 apontou uma evidente diferença de flexibilidade entre estas duas moléculas, mostrando ser possível a ocorrência de movimentos de baixa frequência distintos. Esta comparação evidencia a maior flexibilidade da proteína Cap do vírus PCV2b-w em relação à proteína Cap do PCV2b-mut3 e revela as regiões de maior diferença de flexibilidade entre a proteína Cap selvagem e a que apresenta as mutações M72I, N77D e T200I. As porções de menor flexibilidade na superfície do modelo nonamérico formam três regiões contínuas na superfície do PCV2b-mut3, que, por sua vez, distribuem-se ao redor da tríade central e são próximas aos epítomos estruturais mapeados por Khayat *et al.* (2011) (onde estão localizadas as mutações M72I, N77D e T200I). A proximidade destas zonas mais rígidas em relação às posições mutadas pode favorecer o

reconhecimento de receptores celulares ao tornar os entornos destas regiões estruturalmente mais estáveis. Por outro lado, a ocorrência de regiões mais rígidas próximas aos epítomos estruturais localizados na superfície dos vírus mutantes pode diminuir a afinidade de anticorpos produzidos com base em vacinas comerciais produzidas com variedades virais desprovidas das mutações M72I, N77D e T200I. Esta última especulação sugere a produção de vacinas que contenham vírus da circovirose suína com mutações raras passíveis de emergência natural, de modo a evitar futuros episódios graves de falha vacinal.

Quanto aos trabalhos relativos à expressão heteróloga da proteína Cap do PCV2b-w, os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1) A subclonagem da sequência da proteína Cap do PCV2b-w no vetor de expressão pET-28a(+) foi bem-sucedida, como evidenciado pelos resultados de sequenciamento.

2) A expressão de mRNA correspondente à sequência da proteína Cap introduzida no vetor de expressão pET-28a(+) foi detectada, evidenciando que o processo de transcrição ocorre na *E. coli* BL21(DE3).

3) Os ensaios de *Western Blot* mostraram resultados compatíveis com a produção da proteína Cap do vírus PCV2b-w, apresentando bandas protéicas com massa molecular similar ao produto esperado (23 kDa). Porém, novos estudos são necessários para confirmar a produção da proteína Cap do PCV2b-w e melhorar o rendimento dos ensaios de expressão, possibilitando a produção em maior escala desta proteína e, no futuro, das proteínas Cap dos vírus PCV2b-mut1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os resultados dos trabalhos executados até o momento é evidente que a maior dificuldade encontrada está relacionada à produção das proteínas Cap selvagem e mutantes em quantidades significativas. Como alternativa ao sistema heterólogo até agora empregado, estão sendo planejados experimentos de expressão baseados no emprego do baculovírus. Estes sistemas vêm sendo empregados com sucesso na produção de proteínas Cap e podem resolver a questão da produção em escala destas proteínas dentro de um período de tempo relativamente curto, possibilitando assim a realização de mais experimentos destinados ao estudo estrutural do PCV2.

Com o objetivo de obter mais informações relevantes quanto ao papel da proteína Cap na patogenia do PVC2 também estão sendo delineados trabalhos que possam investigar a influência das mutações da proteína Cap no reconhecimento do vírus por células-hospedeiras. Como já mencionado, Misinzo *et al.* (2006) demonstraram que glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície de células passíveis de infecção pelo PCV2 são capazes de interagir com este vírus e, portanto, são bons candidatos a moléculas receptoras virais. Neste contexto, planejamos executar experimentos de SPR (*Surface Plasmon Resonance* - Ressonância Plasmônica de Superfície) e ITC (*Isothermal Titration Calorimetry* - Calorimetria de Titulação Isotérmica) utilizando os vírus PCV2b-w, PCV2b-mu1, PCV2b-mut2 e PCV2b-mut3 provenientes de cultivo celular e GAGs implicados na infecção do PCV2 para testar a influência das mutações nos mecanismos de reconhecimento de células hospedeiras pelo vírus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALBINA, E., TRUONG, C., HUTET, E. BLANCHARD P., CARIOLET R. L'HOSPITALIER, R., MAHE, D. ALLEE C., MORVAN H. AMENNA, N.L.E. MADEC F. JESTIN, A. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology*. 125: 292-303; 2001.

ALLAN G.M., MCNEILLY F., CASSIDY J.P., REILLY G.A., ADAIR B., ELLIS W.A., McNULTY M.S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol.*; 44(1):49–64 1995.

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

ALLAN, G.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J., Charreyre C. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Research*, v.164, p.4-9, 2012.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.*, v.121, p.1-11, 1999.

ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; McNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B.*, v.41, n.1, p.17-26, 1994.

BAHAR I., LEZON T. R., YANG L. W., EYAL E. Global Dynamics of Proteins: Bridging Between Structure and Function; *Annual Review of Biophysics*; v.39, p.23-42, 2010.

BALASCH M., SEGALÉS J., ROSELL C., DOMINGO M., MANKERTZ A., URNIZA A., PLANA-DURÁN J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* v. 124, p. 139-158. 1999.

BAO F., MI S. LUO Q., GUO H., TU C., ZHU G., GONG W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. *Transbound Emerg Dis.* 2017.

BERNFIELD M., GÖTTE M., PARK P. W., REIZES O., FITZGERALD M. L., LINCECUM J., ZAKO M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* V.68, p.729–777, 1999.

BEST, R.B.; ZHU, X.; SHIM, J.; LOPES, P. E. M.; MITTAL, J.; FEIG, M.; MACKERELL JR, A. D. Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein

Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.*, 8 (9), p.3257–3273, 2012.

BOLIN S.R., STOFFREGEN W.C., NAYAR G.P., HAMEL A.L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.13, p.185-194, 2001.

BOTHNER B., DONG X. F., BIBBS L., JOHNSON J.E., SIUZDAK G. Evidence of Viral Capsid Dynamics Using Limited Proteolysis and Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.673-676, 1998.

BREITEN B., LOCKETT M. R., SHERMAN W., FUJITA S., AL-SAYAH M., LANGE H., BOWERS C. M., HEROUX A., KRILOV G., WHINTESIDES G. M.; Water networks contribute to enthalpy/entropy compensation in protein-ligand binding. *Am. Chem.Soc.* v.135, p.15579-15584, 2013.

BROOKS, B.R.; BROOKS III, C.L.; MACKERELL JR, A.D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R.J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A.R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; KUCZERA, K.; LAZARIDIS, T.; MA, J.; OVCHINNIKOV, V.; PACI, E.; PASTOR, R.W.; POST, C.B.; PU, J.Z.; SCHAEFER, M.; TIDOR, B.; VENABLE, R. M.; WOODCOCK, H. L.; WU, X.; YANG, W.; YORK, D.M.; KARPLUS, M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *Comput. Chem.* 30;30(10); p.1545-614, 2009.

BUCAREY S.A, NORIEGA J., REYES P., TAPIA C., SÁENZ L., ZUÑIGA A., TOBAR J.A. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* v.27, p.5781–5790, 2009.

CALSAMIGLIA, M.; FRAILE, L.; ESPINAL, A.; CUXART, A.; SEMINATI, C.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; DOMINGO, M.; SEGALÉS, J. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res. Vet. Sci.*, v.82, n.3, p.299-304, 2007.

CHEN V. B., ARENDALL III W. B., HEADD J. J., KEEDY D. A., IMMORMINO R. M., KAPRAL G. J., MURRAY L. W., RICHARDSON J. S., RICHARDSON D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography; *Acta Cryst.* D66, p.12-21; 2010.

CHODERA J. D., MOBLEY D. L. Entropy-enthalpy compensation: Role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annu. Rev. Biophys.*; v. 42, p. 121-142, 2013.

CHOI C., KIM J., KANG I.J., CHAE C. Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Vet. Rec.* v. 151 p. 484-485. 2002.

CLARK E.G. Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc West Can Assoc Swine Pract.*, p.19-20, 1996.

CLARK E.G. Postweaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.* p.3, 1997.

CRUZ T. F., ARAUJO JR. J. P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR; *Journal of Virological Methods*; v.196, p.82-85, 2014.

DEL SOLAR G., GIRALDO R., RUIZ-ECHEVARRÍA M.J., ESPINOSA M., DÍAZ-OREJAS R. Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.434-464, 1998.

DOLINSKY T. J., CZODROWSKI P, LI H., NIELSEN J. E., JENSEN J. H., KLEBE G., BAKER N. A. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations; *Nucleic Acids Research*, v.35, p.522-525, 2007.

DUNITZ J. D. Win some, lose some: Enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.*; v.2, p.709-712, 1995.

DUPONT, K., NIELSEN, E. O., BAEKBO, P., & LARSEN, L. E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, v.128, p. 56–64; 2008.

EDGAR R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

ELLIS J., SPINATO M., YONG C., WEST K., MCNEILLY F., MEEHAN B., KENNEDY S., CLARK E., KRAKOWKA S., ALLAN G. Porcine Circovirus 2–Associated Disease in Eurasian Wild Boar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; v.15 , 2003.

FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circovirus – small but powerful. *Virus Res.*, v.143, n.2, p. 177-183, 2009.

GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.23, n.6, p.1151-1163, 2009.

GILLI P., FERRETTI V., GILLI G., BOREA P. A. Enthalpy-entropy compensation in drug receptor binding. *J. Phys. Chem.*; v.98, p. 1515-1518, 1994.

GRAU-ROMA L., HJULSAGER C. K., SIBILA M., KRISTENSEN C. S., LÓPEZ-SORIA S., ENOE C., CASAL J., BOTNER A., NOFRARÍAS M., BILLE-HANSEN V., FRAILE L., BAEKBO P., SEGALÉS J., LARSEN L. E. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from

post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, v. 135, p. 272-282, 2009.

GUO L.J., LU Y.H., WEI Y.W., HUANG L.P., LIU C.M. Porcine Circovirus type 2 (PCV2); genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virology Journal*, v. 7; p. 273-284; 2010.

GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.56, p.313-329, 1999.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.*, v.72, n.6, p.5262-5267, 1998.

HARDING J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. West. Can. Assoc. Swine Pract.*, p.21, 1996.

HARDING J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract*, p. 503; 1997.

HARMON, K.M., GAUGER, P.C., ZHANG, J., PIÑEYRO, P.E., DUNN, D. Y CHRISWELL, A.J. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States. *Genome Announcements*; 3(6), 2015.

HARMS P.A., SORDEN S.D., HALBUR P.G., BOLIN S.R., LAGER K.M., MOROZOV I., PAUL P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.*, v.38, p.528-539, 2001.

HARRISON S. C., OLSON A. J., SCHUTT C. E., WINKLER F. K., BRICOGNE G. Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, v. 276, p.368-373, 1978.

HU G., WANG N., YU W., WANG Z., ZOU Y., ZHANG Y., WANG A., DENG Z., YANG Y. Generation and immunogenicity of porcine circovirus type 2 chimericvirus-like particles displaying porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 epitope B. *Vaccine*; v. 34, p. 1896-1903, 2016.

HUANG B, SCHROEDER M. LIGSITEcsc: predicting ligand binding sites using the Connolly surface and degree of conservation. *BMC Struct Biol.* p.6:19; 2006.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.*, v14, p.33-38, 1996.

- HUNG L.C., YANG C.Y., CHENG I.C. Peptides mimicking viral proteins of porcine circovirus type 2 were profiled by the spectrum of mouse anti-PCV2 antibodies. *BMC Immunology*. 18:25, 2017.
- J.Y. ZHOU, S.B. SHANG, H. GONG, Q.X. CHEN, J.X. WU, H.G. SHEN, T.F. CHEN, J.Q. GUO. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* V.118, p.201–211, 2005.
- JO S, KIM T, IYER V.G., IM W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem.*; v.11, p.1859-1865, 2008.
- JOLLIFFE I. T. Principal Component Analysis and Factor Analysis. In: Principal Component Analysis. *Springer Series in Statistics*. Springer, New York, NY; 2002.
- KIM J. HAN D.U., CHOI C., CHAE C. Differentiation of porcine circovirus PCV-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*, v.98; p. 25-31, 2001.
- KRAKOWKA S., ALLAN G., ELLIS J., HAMBERG A., CHARREYRE C., KAUFMANN E., BROOKS C., MEEHAN B. A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence. *Virus Research*, v.164, p.90-99, 2012
- KRAKOWKA, S., ELLIS, J.A., MEEHAN, B., KENNEDY, S., MCNEILLY, F., ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* v. 37, p. 254–263, 2000.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n. 1. p. 680-685, 1970.
- LAROCHELLE R. BIELANSKI A. MULLER P., MAGAR R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* v. 38; p. 4629-4632, 2000.
- LEKCHAROENSUK, P., MOROZOV, I., PAUL, P.S., THANGTHUMNIYOM, N., WAJ-JAWALKU, 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.
- LEWIS, J. K., BOTHNER, B., SMITH, T. J. & SIUZDAK, G. Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.6774-6778, 1998.
- LI Q., YAFAL A.G., LEE Y.M., HOGLE J., CHOW M. Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure

of these sequences at physiological temperature. *Journal of Virology*; 68(6): 3965–3970. 1994.

LIU J., HUANG L., WEI Y., TANG Q., LIU D., WANG Y., LI S., GUO L., WU H., LIU C. Amino acid mutations in the capsid protein produce novel porcine circovirus type 2 neutralizing epitopes. *Veterinary Microbiology*; v. 165; n 3–4; p. 260-267; 2013.

LIU J., THORP S. C. Cell Surface Heparan Sulfate and Its Roles in Assisting Viral Infections; *Medicinal Research Reviews*; v.22, p1-25, 2002.

LIU L.J., SUZUKI T., TSUNEMITSU H., KATAOKA M., NGATA N., TAKEDA N., WAKITA T., MIYAMURA T., LI T.C.. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus, *Arch. Virol.*, V.153, p.2291–2295; 2008.

LIU Q, TIKOO SK, BABIUK LA: Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*; v.285: p.91–99; 2001.

LIU Q., WANG L., WILLSON P., O'CONNOR B., KEENLISIDE J., CHIRINO-TREJO M., MELÉNDEZ R., BABIUK L. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 225–231, 2002.

MAHÉ 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. *J Gen Virol.* V. 81, p.1815-1824. 2000.

MANKERTZ A. Molecular interactions of porcine circoviruses type 1 and type 2 with its host. *Virus Res.*; v.164, p.54–60; 2012.

MANKERTZ, A.; CALISKAN, R.; HATTERMANN, K.; HILLENBRAND, B.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; SCHMITT, C.; STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet. Microbiol.*, v. 98, n.2, p. 81-88, 2004.

MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G.; BUHK, H.J. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.*, v. 71, n.3, p.2562-2566, 1997. MEEHAN, B.M.; CREELAN, J.L.; MCNULTY, M.S.; TODD, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus. *J. Gen. Virol.*, v.78, pt.1, p.221-227, 1997.

MARCEKOVA Z., PSIKAL I., KOSINOVA E., BENADA O., SEBO P., BUMBA L. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies *J. Virol. Methods*; v.162, p. 133–141, 2009.

MISINZO, G., Delputte P.L., Meerts p., Lefebvre D.J., Nauwynck H.J. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.*, v. 80, p. 3487-3494, 2006.

MORI M., SATO K., AKACHI S., ASAH I S., TANIGUCHI S., NARITA M. Retrospective Study of Porcine Circovirus 2 Infection in Japan: Seven Cases in 1989. *Vet Pathol.*; v. 37, p. 667-669 2000.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.9, p.2535-2541, 1998.

NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN SR, HARMS PA, SORDEN SD, PAUL PS: Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* ; v.81:p.2281– 2287, 2000.

NIELSEN J., VINCENT I. E., BOTNER A., LADEKJAER-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.

OKUDA Y., ONO M., YAZAWA S., SHIBATA I. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.15, p.107-114, 2003.

OPRIESSNIG T., HALBUR P. G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res* v. 164, p. 20–32; 2012.

OPRIESSNIG T., MENG X. J., HALBUR P. G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* ; v.19, p. 591–615. 2007.

OPRIESSNIG T., RAMAMOORTHY S., MADSON D. M., PATTERSON A. R., PAL N., CARMAN S., MENG X. J., HALBUR P. G. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J. Gen. Virol.*, v.89, p.2482-2491, 2008.

P.C. WU, W.L. LIN, C.M. WU, J.N. CHI, M.S. CHIEN, C. HUANG. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; v. 95 p.1501–1507, 2012.

QIAN H. Entropy-enthalpy compensation: Conformational fluctuation and induced-fit. *J. Chem. Phys.*; v.109, p. 10015-10017, 1998.

RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. J. Porcine circovirus: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim. Health Res. Rev.*, v.10, n.1, p.1-20, 2008.

REINER G., WILLEMS H. Porcine circovirus 2 (PCV2) associations between sequence, function and virulence. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.115, p.449-456, 2008.

ROSE N, OPRIESSNIG T, GRASLAND B, JESTIN A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.*;v. 164 p. 78–89; 2012.

ROSELL C., SEGALÉS J., PLANA-DURÁN 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. *J. Comp. Pathol.*; v. 120, p. 59-78. 1999.

ROSTAND K. S., ESKO J. D. Microbial Adherence to and Invasion through Proteoglycans; *Infection and Immunity*; v.65, p.1-8, 1997.

ROVIRA A, BALASCH M, SEGALÉS J, GARCÍA L, PLANA-DURÁN J, ROSELL C, ELLERBROK H, MANKERTZ A, DOMINGO M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.*, v.76, p.3232-3239, 2002.

RYCKAERT J. P., CICCOTTI G., BERENDSEN H. J. C. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes; *Journal of Computational Physics*; v. 23, p. 321-341 1977.

RYDE U. A fundamental view of enthalpy-entropy compensation. *Med. CHem. Commun.*; v. 5, p. 1324-1336, 2014.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.: Molecular Cloning: a laboratory manual.2. ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SEGALÉS J., ALLAN G.M., DOMINGO M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, v. 6, p. 119-142, 2005.

SEGALÉS, J., OLVERA, A., GRAU-ROMA, L., CHARREYRE, C., NAUWYNCK, H., LARSEN, L., DUPONT, K., MCCULLOUGH, K., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., MANKERTZ, A., FREDHOLM, M., FOSSUM, C., TIMMUSK, S., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., BEATTIE, V., ARMSTRONG, D., GRASSLAND, B., BAEKBO, P., ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record* v.162, p. 867-868; 2008.

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.

SHIBATA I., OKUDA Y., KITAJIMA K., ASAI T. Shedding of porcine circovirus into colostrum as shown. *Journal of Veterinary Medicine Series B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. v. 53, p. 278-280. 2006.

SHIBATA I., OKUGA Y., YAZAWA S., ONO M. SASAKI T. ITAGAKI M., NAKAJIMA N., OKABE Y., HIDEJIMA I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 65 p. 405-408; 2003.

SPEIR, J. A.; JOHNSON, J. E. Virus particle structure: non-enveloped viruses. In: MAHY BWJ, V. R. M. (Ed.). *Encyclopedia of Virology*. 3. Oxford, UK: Elsevier Academic Press, p.380-393, 2008.

STEINER, E.; BALMELLI, C.; HERRMANN, B.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, v. 378, p.311-322, 2008.

STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Functional analysis of cis- and trans-acting replication factors of Porcine Circovirus Type 1. *J. Virol.*, v.81, n.11, p.5696-5704, 2007.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v 30, p. 2725–2729; 2013.

TIMCHENKO T, KOUCHKOVSKY F, KATUL L, DAVID C, VETTEN HJ, GRONENBORN B. A single rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. *J Virol.*; v. 73, p. 10173–10182; 1999.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.*, v.295, n.5844, p.64-66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of Porcine Circovirus. *Arch. Virol.*, v.91, n.3-4, p.271-276, 1986.

TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.*, v.96, n.1-2, p.39-57, 1987.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus –like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A.*, v. 226, n.2, p.153-167, 1974.

TODD, D.; BENDINELLI, M.; BIAGINI, P. *et al.* Circoviridae. In: Fauquet, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J. *et al.* (Eds.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press: San Diego, p.327-334. 2005.

TOMÁS A., FERNANDES L. T., VALERO O., SEGALÉS J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.*, v.132, p.260-273, 2008.

TRUNDOVA M., CELER V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*, v.34, p.199–204, 2007.

TU Y., WANG Y., WANG G., WU J., LIU Y., WANG S., JIANG C., CAI X. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; v.97, p.2867–2875, 2013.

VANDERPLASSCHEN A., BUBLOT M., DUBUISSON J., PASTORET P. P., THIRY E. Attachment of the Gammaherpesvirus Bovine Herpesvirus 4 Is Mediated by the Interaction of gp8 Glycoprotein with Heparinlike Moieties on the Cell Surface; *Virology*, v.196, p.232-240, 1993.

VEGA-ROCHA, S.; BYEON, I.J.; 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. *J. M. Biol.*, v.367, n.2, p.473-487, 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. *Vet. Diagn. Invest.*; v. 11, p. 530-532. 1999.

WIEDERKEHR, D. D.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; HAESSIG, M.; ZIMMERMANN, D.; POSPISCHIL, A.; BRUGNERA, E.; SIDLER, X. A new emerging genotype 54 subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.136, n.1-2, p.27–35, 2009.

WIEDERSTEIN M., SIPPL M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, p.407–410, 2007.

WU P. C., CHEN T. Y., CHI J. N., CHIEN M. S., HUANG C. Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2virus-like particles in *Escherichia coli*; *J. Biotech*; v. 220, p. 78-85, 2016.

XIAO C.T., HALBUR P.G., OPRIESSNIG T. Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 2b Variant Present in Cases of Vaccine Failures in the United States. *Journal of Virology*, v. 86; n.22; 12469. 2012.

ZANELLA J.R.C., MORAES N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 55, p. 522-527; 2003.