

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/06/2026.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”
Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

LARISSA BALDO VIEIRA

PRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE PARTÍCULAS VIRAIS INFECTANTES DO PCV2b A
PARTIR DE GENOMAS SINTÉTICOS

BOTUCATU

2024

LARISSA BALDO VIEIRA

**PRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE PARTÍCULAS VIRAIS INFECTANTES DO
PCV2b A PARTIR DE GENOMAS SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Angelo José Magro

Co-orientadora: Dra. Taís Fukuta da Cruz

Botucatu

2024

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

Vieira, Larissa Baldo.

Produção experimental de partículas virais infectantes do
PCV2b a partir de genomas sintéticos / Larissa Baldo Vieira.
- Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Coorientador: Angelo José Magro

Coorientador: Taís Fukuta da Cruz

Capes: 90400003

1. Circovirus. 2. Montagem de vírus. 3. Engenharia
genética. 4. Transfecção.

Palavras-chave: Circovírus suíno; Engenharia genética;
Montagem viral; Transfecção.

LARISSA BALDO VIEIRA

**PRODUÇÃO EXPERIMENTAL DE PARTÍCULAS VIRAIS INFECTANTES DO
PCV2b A PARTIR DE GENOMAS SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Data da defesa: 27/06/2024.

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

UNESP - Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

Prof^a. Dr^a. Daniela Carvalho dos Santos

UNESP - Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

Doutora Camila Dantas Malossi

UNESP -Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex) / FMB - Campus de Botucatu

Dedico este trabalho à minha família, que
sempre me incentivou a trilhar o caminho do
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Lelis Vieira Júnior e Rosaura Aparecida Baldo Vieira**, ao meu irmão, **Lelisberto Baldo Vieira**, e à minha avó paterna, **Judite Alves Vieira**, agradeço pelo constante incentivo aos estudos e pelo apoio incondicional às minhas escolhas, mesmo nas situações mais adversas e desafiadoras. À minha prima **Lays Alves Barbosa**, agradeço por sempre me encorajar a persistir e por auxiliar, com incansável dedicação e energia, na organização das minhas pendências.

Aos meus professores **Dr. João Pessoa Araújo Junior e Dr. Angelo José Magro**, expresso minha profunda gratidão pelas oportunidades que proporcionaram para viabilizar meus estudos, pelo apoio em situações que até transcenderam o ambiente acadêmico e pelo conhecimento compartilhado ao longo da minha formação. À minha coorientadora, **Dra. Taís Fukuta da Cruz**, agradeço pelos conhecimentos iniciais compartilhados. Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Prof. Dr. Marcelo Santos da Silva, Prof. Dra. Daniela Carvalho dos Santos**, e a **Dra. Camila Dantas Malossi**, sou grata pelas considerações enriquecedoras ao meu trabalho, mesmo diante dos prazos restritos.

Aos meus amigos de laboratório, **Dra. Letícia Calixto Romero, Dr. Leonardo Ereno Tadielo, Me. Amanda Haisi, Me. Eliana Leonor Hurtado Celis e Me. Evelyn Cristine da Silva**, agradeço pelo auxílio em alguns experimentos, pelas discussões enriquecedoras sobre resultados e perspectivas, bem como pelos momentos de descontração compartilhados em cafés e cervejas. À minha amiga **Dra. Caroline Rodrigues Basso**, agradeço também pela valiosa experiência compartilhada e pela oportunidade de colaborarmos juntas. À minha amiga, **Me. Bruna Lindolfo Da Silva**, sou grata não apenas pelo apoio técnico no trabalho, mas também por todas as conversas e momentos de descontração compartilhados. Ao meu amigo **Eric Antônio Vieira**, agradeço também pelas diversas situações, desde a organização de eventos até a rotina do laboratório. Aos estagiários que passaram pelo grupo de pesquisa e principalmente ao meu amigo **Kayo De Paiva Pereira**, sou grata por me acompanharem em inúmeros episódios de descontaminação e organização do NB2 de cultivo celular, além dos momentos de descontração.

Às minhas amigas e companheiras de morada, **Gabriele Gimenes e Débora Gomes da Silva**, agradeço pelo apoio, paciência e pelas risadas compartilhadas, mesmo nos dias mais difíceis. Ao meu amigo e colega de mestrado, **Me. João de Freitas Gomes Neto**,

sou grata pelos momentos desafiadores que enfrentamos juntos nas disciplinas e na organização de eventos, sempre com bom humor.

Agradeço também aos funcionários, professores e demais colaboradores do IBTEC por sempre promoverem um excelente ambiente de trabalho, compartilhando equipamentos, reagentes e conhecimento com muita generosidade. Expresso também minha sincera gratidão a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Na impossibilidade de nomear cada um individualmente, deixo aqui meu profundo reconhecimento a todos.

Finalmente, agradeço ao apoio processo nº 2022/04023-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ressalto que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

VIEIRA, L. B. **Produção experimental de partículas virais infectantes do PCV2b a partir de genomas sintéticos**. 2024. 66f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2024.

O Circovírus suíno (PCV) é prevalente na população mundial de suínos e é notável por ser o menor vírus conhecido em termos de genoma e estrutura. Além disso, possui a capacidade de replicação autônoma, o que o torna um modelo interessante para estudos *in vitro*. Entre as diferentes espécies desse vírus, o PCV2 se destaca por estar associado à Síndrome da Circovirose Suína (SCS), um conjunto de sinais clínicos que afetam vários órgãos, sendo a manifestação mais comum a perda dos índices zootécnicos, levando os animais infectados ao definhamento e a outras lesões. O PCV2 apresenta uma molécula alvo importante, a proteína Cap, que constitui seu capsídeo e está diretamente relacionada à resposta imunológica do hospedeiro. A espécie PCV2b circula com particular relevância no Brasil. O monitoramento e a prevenção dessa infecção, bem como a melhor compreensão de aspectos essenciais à estrutura viral, podem ajudar a evitar perdas econômicas significativas aos produtores e contribuir com o melhoramento do bem-estar animal. Com isso, este trabalho teve como objetivo principal a padronização e execução de procedimentos para induzir a replicação viral autônoma do PCV2b em cultura de células a partir de um genoma viral construído artificialmente com base em um genoma viral selvagem sequenciado. Assim, o genoma viral sintético foi transfectado em células de linhagem de testículo suíno (ST), esta cultura de células foi mantida sob condições ideais e submetida a passagens para acomodar o crescimento e a renovação celular. O DNA viral desta cultura de células foi quantificado por qPCR em intervalos de 24 horas. A produção da proteína do capsídeo foi analisada por ELISA. Um ensaio de infecção em cultivo celular foi realizado com o sobrenadante das células transfectadas e mantidas. O DNA viral foi detectado em todos os intervalos de coleta, tanto nas células submetidas aos ensaios de transfecção quanto nas de infecção. A quantificação da carga viral mostrou uma relação direta à confluência celular. A presença da proteína Cap foi confirmada por ELISA. A estrutura externa das partículas virais sintéticas foi visualizada a partir de microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa. Portanto, a produção experimental de partículas virais infectantes do PCV2b a partir de genomas sintéticos tem como vantagem a realização de estudos experimentais com mutações

específicas. A padronização da produção de partículas virais sintéticas permite a obtenção de partículas virais a partir do genoma viral desenhado com quaisquer alterações de interesse. É possível explorar alterações baseadas em simulações computacionais, o que abre caminho para pesquisas futuras que explorarão aspectos essenciais da montagem e estabilidade do capsídeo desse vírus e pode, por exemplo, nortear o desenvolvimento de futuras vacinas ou outros produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: Circovírus suíno; montagem viral; engenharia genética; transfecção.

ABSTRACT

VIEIRA, L. B. **Experimental production of PCV2b infecting viral particles from synthetic genomes**. 2024. 66f. Master's Thesis – Botucatu Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2024.

Circovirus porcine (PCV) is prevalent in the global swine population and is notable for being the smallest known virus in terms of genome size and structure. Additionally, it has the ability to replicate autonomously, making it an interesting model for in vitro studies. Among the different species of this virus, PCV2 stands out for being associated with Circovirus Porcine Syndrome (SCS), a collection of clinical signs that affect various organs, with the most common manifestation being the loss of zootechnical performance, leading infected animals to wasting and other lesions. PCV2 has an important target molecule, the Cap protein, which constitutes its capsid and is directly related to the host's immune response. The PCV2b species circulates with particular relevance in Brazil. Monitoring and preventing this infection, as well as better understanding key aspects of viral structure, can help avoid significant economic losses for producers and contribute to the improvement of animal welfare. Thus, the main objective of this study was to standardize and execute procedures to induce autonomous replication of PCV2b in cell culture using an artificially constructed viral genome based on a sequenced wild-type viral genome. The synthetic viral genome was transfected into porcine testis (ST) cell lines, and this cell culture was maintained under optimal conditions and passaged to accommodate cell growth and renewal. Viral DNA from this cell culture was quantified by qPCR at 24-hour intervals. Capsid protein production was analyzed by ELISA. A cell culture infection assay was performed using the supernatant from the transfected and maintained cells. Viral DNA was detected at all collection intervals, both in the cells subjected to transfection assays and in those used for infection assays. Viral load quantification showed a direct relationship with cell confluence. The presence of the Cap protein was confirmed by ELISA. The external structure of the synthetic viral particles was visualized using transmission electron microscopy with negative staining. Therefore, the experimental production of infectious PCV2b viral particles from synthetic genomes offers the advantage of performing experimental studies with specific mutations. Standardizing the production of synthetic viral particles allows for the generation of viral particles from a viral genome designed with any desired alterations. Alterations based on computational

simulations can be explored, paving the way for future research that will explore key aspects of capsid assembly and stability in this virus, which could guide the development of future vaccines or other biotechnological products.

Keywords: Circovirus porcine; viral assembly; genetic engineering; transfection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Circovírus suíno.....	13
1.2. O circovírus e seu potencial como agente zoonótico.....	18
1.3. Estudos com o circovírus suíno como modelo.....	20
1.4. Técnicas em Biologia Molecular.....	24
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Genotipagem e sequenciamento do genoma viral selvagem.....	31
3.2. Plasmídeos e clonagem molecular.....	32
3.3. Construção do genoma viral sintético.....	35
3.4. Validação da construção do genoma viral sintético.....	36
3.5. Cultivo de células de linhagem de testículo suíno (ST).....	37
3.6. Produção de partículas virais sintéticas.....	38
3.7. Validação da produção de partículas virais sintéticas.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Genotipagem e sequenciamento do genoma viral selvagem.....	42
4.2. Plasmídeos e clonagem molecular.....	43
4.3. Construção do genoma viral sintético.....	45
4.4. Validação da construção do genoma viral sintético.....	45
4.5. Cultivo de células de linhagem de testículo suíno (ST).....	47
4.6. Produção de partículas virais sintéticas.....	48
4.7. Validação da produção de partículas virais sintéticas.....	49
5. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Circovírus suíno

O circovírus suíno é classificado dentro do gênero *Circovirus* e da família *Circoviridae*, sendo, até o momento, considerados os menores patógenos virais capazes de replicação autônoma em células animais. Suas partículas têm uma estrutura icosaédrica com um diâmetro de 15 a 25 nanômetros e possuem genomas muito pequenos, que variam de 1.7 a 2.1 kb de extensão e são constituídos por uma molécula de DNA de fita simples (ssDNA) circular (Figura 1). O genoma *ambisense* destes vírus consiste em duas ORFs principais e duas regiões intergênicas, uma das quais contém a origem de replicação (BREITBART et al., 2017).

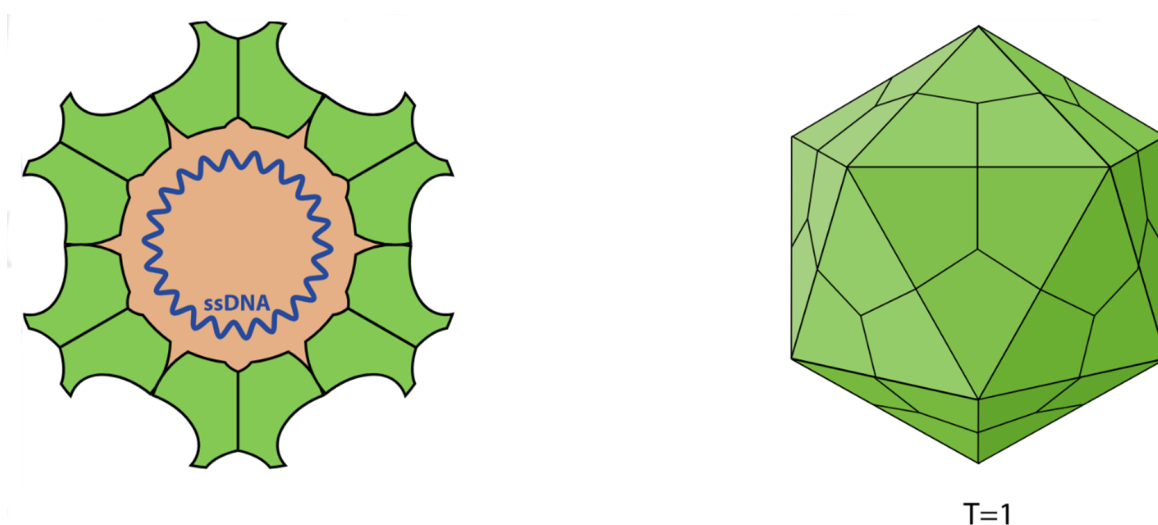


Figura 1. Estrutura dos Circovírus. Representação esquemática da estrutura dos circovírus, onde o DNA circular fita simples (ssDNA) está representado em azul e o capsídeo está representado em verde. O capsídeo é composto por 60 unidades assimétricas (T=1) de uma única proteína (Cap).
Fonte: Viralzone.

A replicação do genoma do Circovírus Suíno é altamente dependente de proteínas da fase S do ciclo celular, mas ocorre de forma independente da replicação do DNA ou RNA celulares do hospedeiro, utilizando um mecanismo de replicação do tipo círculo rolante. Portanto, esses vírus são considerados vírus de replicação autônoma, uma vez que podem

codificar enzimas essenciais para a replicação com a sequência do próprio DNA viral (FLORES, 2012; TISCHER et al., 1987).

O circovírus suíno foi caracterizado pela primeira vez em 1982, sendo um vírus de tamanho extremamente pequeno, com cerca de apenas 17 nanômetros de diâmetro. Foi observado que esse vírus estava constantemente presente em culturas de células de rim suíno (PK-15), porém sem causar efeito citopático (TISCHER et al., 1982). A origem de replicação de seu genoma é composta por uma estrutura em forma de haste que inclui uma sequência octanucleotídica cercada por palíndromos (Figura 2), que é delimitada pelas duas ORFs principais; na fita positiva, encontramos a ORF1, que codifica as proteínas Rep e Rep', desempenhando um papel crucial na iniciação da replicação, enquanto que a ORF2, localizada na fita negativa do genoma, codifica a proteína Cap, que forma as 60 subunidades componentes do capsídeo viral (Figura 3). As proteínas Rep e Rep' diferem devido ao *splicing* alternativo no transcrito que as codifica (FAUREZ et al., 2009).

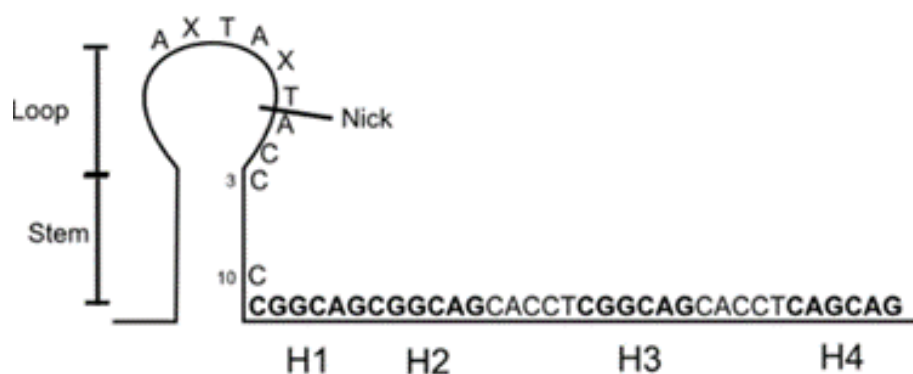


Figura 2. Origem de replicação do PCV. Origem de replicação composta por uma estrutura em forma de haste (*Stem-loop*) que inclui uma sequência octanucleotídica cercada por palíndromos. H1: Hexâmero 1; H2: Hexâmero 2; H3: Hexâmero 3; H4: Hexâmero 4. Pentâmeros CACCT.

Fonte: Adaptado de FAUREZ et al., 2009.

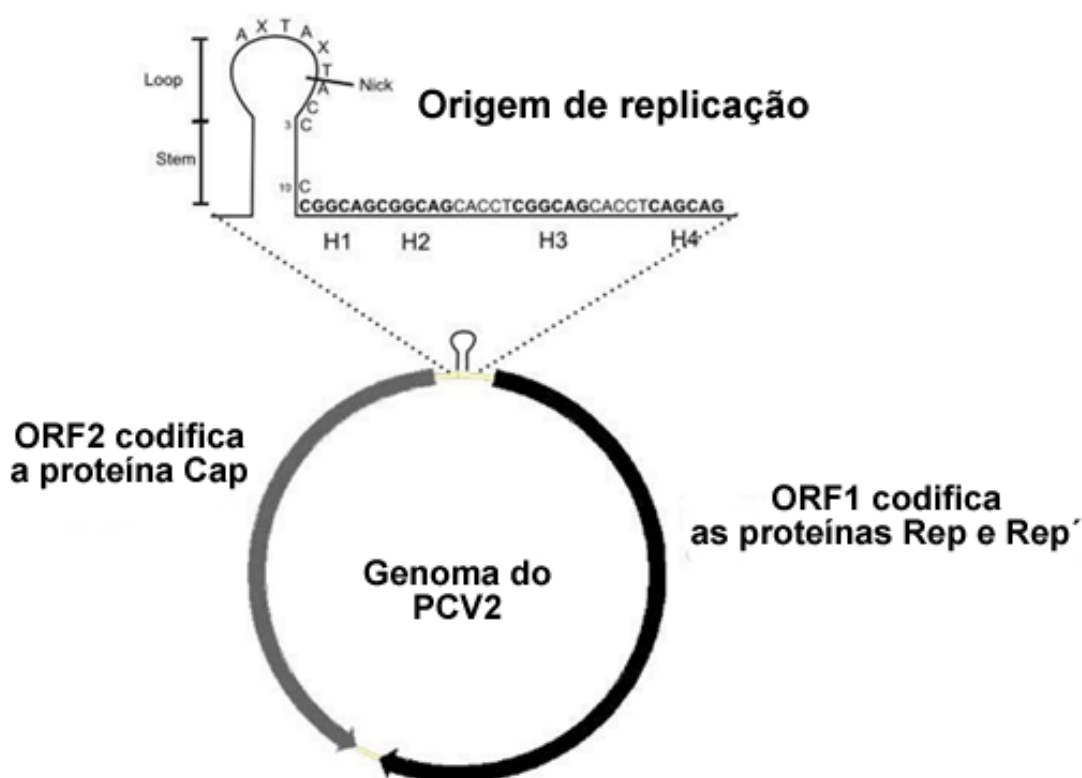


Figura 3. Representação do genoma do PCV. Seta preta: Região aberta de leitura 1 (ORF1), localizada na fita positiva, que codifica as proteínas Rep e Rep'. Seta cinza: Região aberta de leitura 2 (ORF2), localizada na fita negativa, que codifica a proteína do capsídeo. Entre as ORF1 e ORF2 estão as regiões intergênicas. A origem da replicação está localizada na região intergênica entre as ORFs 1 e 2. H1, H2, H3 e H4 são hexâmeros.

Fonte: Adaptado de FAUREZ et al., 2009.

O processo de replicação está esquematizado na figura 4 e começa pela duplicação do genoma ssDNA circular, seguido de clivagem do *loop* de DNA pela Rep, gerando uma extremidade livre 3'OH. Em seguida, a DNA polimerase celular inicia a replicação do DNA viral a partir dessa extremidade. Quando uma unidade do genoma é replicada, o complexo REP fecha o *loop* covalentemente, resultando na liberação de uma molécula de DNA parental de fita simples circular positiva e uma molécula de DNA de fita dupla circular composta pela fita parental negativa e a fita positiva recém-sintetizada. A molécula de fita simples pode ser encapsulada ou participar de um segundo ciclo de replicação (FAUREZ et al., 2009).

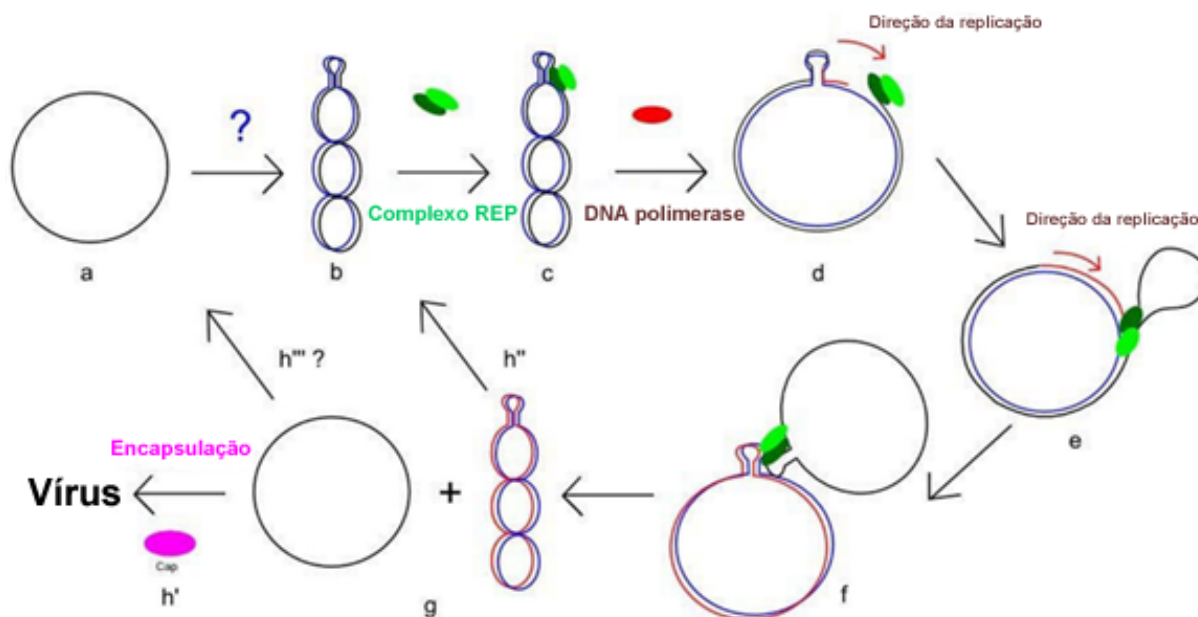


Figura 4. Modelo de replicação de círculo rolante de vírus de fita simples. Fita preta: fita parental positiva e genoma viral. Fita azul: fita negativa gerada da duplicação inicial do ssDNA circular. Fita vermelha: fio condutor positivo, funciona como *primer* para a DNA polimerase. **a e b:** a conversão do genoma viral de fita simples em intermediário replicativo de DNA de fita dupla produzido na célula; **c e d:** complexo REP liga-se à estrutura haste que é a origem da replicação e inicia a replicação cortando o DNA; **d e e:** a DNA polimerase celular inicia a replicação do DNA viral da extremidade 3'OH livre e o complexo REP mantém-se ligado à extremidade 5'; **f e g:** depois de uma rodada de replicação, o complexo REP fecha o DNA e libera um DNA de fita simples e um DNA de fita dupla. h', h'' e h''': DNA pode ser usado para replicação ou pode ser encapsulado.

Fonte: Adaptado de FAUREZ et al., 2009.

Quatro espécies do circovírus suíno foram identificadas: PCV1, PCV2, PCV3 e PCV4 (BREITBART et al., 2017). O PCV1 foi inicialmente reconhecido como um contaminante persistente de células de linhagem de rim suíno (PK-15) (TISCHER; RASCH; TOCHTERMANN, 1974). Já o PCV2 foi caracterizado por Meehan e colaboradores (1998) a partir de sequenciamento de amostras de suínos da América do Norte e Europa que exibiam sintomas da Síndrome Multissistêmica do Definhamento e (SMDS) e comparadas com a sequência do genoma do PCV isolado de cultura de células de rim suíno (MEEHAN et al., 1998). O PCV3, por sua vez, foi descoberto por Phan e colaboradores (2016) por meio de análises metagenômicas e sequenciamento de amostras de casos clínicos com sintomas muito semelhantes à Síndrome da Circovirose Suína (SCS), mas sem detecção de PCV2 nos testes diagnósticos (PHAN et al., 2016). Finalmente, o PCV4 foi identificado e caracterizado por Zhang e colaboradores (2020) a partir de análises de amostras por PCR, qPCR e sequenciamento (ZHANG et al., 2020).

Entre as espécies mencionadas, é importante destacar o PCV2, uma vez que este é reconhecido como um vírus de extrema importância para a saúde suína em nível global,

estando associado à ocorrência de óbitos e à redução do desempenho zootécnico dos suínos, o que leva em consequência a consideráveis perdas econômicas nas criações (CASTRO et al., 2007). A natureza patogênica do PCV2 é ainda mais preocupante pelo fato de que esse vírus apresenta uma elevada taxa evolutiva, com aproximadamente $1,2 \times 10^3$ substituições/sítio/ano, que ocorrem especialmente na região da ORF2 (MAITY et al., 2023), que é a responsável pela codificação da proteína do capsídeo, a qual, por sua vez, desempenha um papel crucial na antigenicidade e virulência do PCV2 (WEI et al., 2019).

A Síndrome da Circovirose Suína (SCS) é o conjunto de manifestações clínicas ocasionadas pelo PCV2 (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016) que afetam vários sistemas do organismo suíno, incluindo a condição denominada síndrome multissistêmica do definhamento (SMDS), que é bastante comum e que acomete os animais durante suas primeiras semanas de vida. A transmissão da SCS pode ocorrer tanto verticalmente quanto horizontalmente, sendo as vias oronasal e fecal as mais comuns. Além disso, a síndrome é altamente influenciada por cofatores infecciosos (FLORES, 2012). Adicionalmente, dentre as várias patologias observadas em animais infectados por circovírus, incluem-se as hepatites (ROSELL; SEGALÉS; DOMINGO, 2000).

Um estudo realizado por Hamel e colaboradores (1998) demonstrou que o PCV2 possui nove nucleotídeos a mais em relação ao PCV1, totalizando 1768 bases. Ainda, trabalhos de sequenciamento demonstraram que o PCV2 apresenta uma variedade genotípica significativa, uma vez que foram identificadas três diferentes genótipos deste vírus (PCV2a, PCV2b e PCV2c) (SEGALÉS et al., 2008). Em seguida, foram descritos mais dois genótipos, PCV2d e PCV2e, em diversos países (GUO et al., 2010; HARMON et al., 2015; WIEDERKEHR et al., 2009; XIAO et al., 2012), além de um sexto genótipo (PCV2f) (BAO et al. 2017). Mais recentemente, outros dois genótipos (PCV2g e PCV2h) foram identificados por Franzo e Segales (2018), seguidos por mais um novo genótipo (PCV2i) descoberto por Wang e colaboradores (2020). É interessante observar que entre os genótipos identificados, o PCV2d foi o predominante na população estudada, embora o PCV2b também circule com significativa relevância (WANG et al., 2020).

No Brasil, o PCV2b é de particular relevância, como indicado por um estudo realizado por Rodrigues e colaboradores. Nesse estudo, uma avaliação da prevalência das diferentes espécies de PCV no Brasil no período de 2009 a 2017 revelou uma maior predominância do PCV2b (RODRIGUES et al., 2020), o que ressalta a importância de

compreender e investigar mais a fundo o PCV2b e suas características específicas devido ao cenário nacional.

1.2. O circovírus e seu potencial como agente zoonótico

O último relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH - organização intergovernamental fundada em 1924 e autoridade mundial em saúde animal) citou que os circovírus representam um risco desconhecido de infecção em relação aos humanos (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2020), no entanto diversas pesquisas destacam a importância de considerar esse vírus no contexto da saúde humana. Como exemplo da potencial importância dos circovírus, foi relatado que um episódio de administração de vacinas contaminadas pelo PCV1 não trouxe evidências de que o DNA do PCV, ou mesmo suas partículas virais, sejam prejudiciais aos humanos (VICTORIA et al., 2010). No entanto, um estudo investigativo hipotetizou que o PCV1 poderia ter se adaptado à linhagem celular utilizada na produção das vacinas contaminadas (células Vero, derivadas de primatas). Essa hipótese foi confirmada a partir do isolamento e caracterização quase completa da sequência genômica do PCV1 presente na vacina, que demonstrou ser uma variante única, confirmando sugestões anteriores de que as células das linhagens citadas utilizadas pelo fabricante foram, provavelmente, a fonte de contaminação. Portanto, é razoável supor que tal adaptação poderia ser acompanhada de um processo de alteração da patogenicidade viral, o que facilitaria a transmissão entre espécies e a ocorrência de doenças em humanos (GILLILAND et al., 2012). Sabe-se também que o PCV2 é capaz de infectar células humanas *in vitro*, embora a eficiência de infecção seja menor em linhagens celulares humanas em comparação com células de suínos. Neste caso, a cultura de PCV2 em linhagens de células humanas, incluindo células hepáticas, demonstra de forma clara a necessidade de investigar o potencial zoonótico do PCV2 (LIU et al., 2019). Além disso, do ponto de vista molecular, a natureza promíscua do PCV2 é única e pode ser explicada pelo uso do *heparan sulfate*, um glicosaminoglicano rico em cargas negativas presente em proteoglicanos de membrana de células variadas, incluindo muitas células humanas como receptor viral (FENG; SCHREYER; KHAYAT, 2016). Da mesma forma, o PCV2 pode invadir as células 3D4/31 predominantemente pela via da endocitose mediada por clatrina utilizando também

glicosaminoglicanos como o *heparan sulfate* e o sulfato de dermatan como principais receptores para ligação às células hospedeiras (MISINZO et al., 2005).

É importante também ressaltar que um trabalho publicado por Biagini em 2004 reuniu descrições da presença de circovírus em diversos indivíduos de várias regiões do mundo, com alta prevalência em vários fluidos corporais. A variabilidade genética viral observada foi alta e a coinfeção por cepas virais distintas era comum em um mesmo indivíduo. De acordo com estes autores, embora os TTVs (vírus transmitidos por transfusão) e os TLMVs (mini vírus semelhantes aos TTVs), descobertos em 1997, não tenham mostrado homologia de sequência significativa com qualquer outro circovírus animal e não fossem oficialmente incluídos na família Circoviridae pelo ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus), seria possível que esses sejam os primeiros membros de um novo grupo de circovírus que infectam humanos, possivelmente envolvidos em uma determinada patologia (BIAGINI, 2004). Outro trabalho recente relatou a descoberta de um novo vírus da família Circoviridae em uma paciente de sessenta e um anos de idade, profundamente imunossuprimida, que havia sido submetida a um transplante de coração dezoito anos antes de ser internada com hepatite aguda de causa desconhecida. As análises de metagenômica *shotgun* revelaram um suposto novo membro da família Circoviridae, um parente distante do PCV3, conhecido por infectar diferentes espécies animais. Esse novo vírus, com aproximadamente 2021 nucleotídeos (Código GenBank ON526744), foi provisoriamente nomeado *Circovirus parisii*, e sua descoberta destaca que a hepatite de origem indeterminada pode ser causada por diferentes patógenos, incluindo alguns emergentes (RODRIGUEZ et al., 2023). Análises realizadas por Silva et al. (2024) indicaram ainda 100% de identidade da proteína Cap do Circovírus humano 1 com o *Circovirus parisii* e 34,59% da proteína Cap deste último com o PCV3, evidenciando, assim, características similares desse novo vírus com seus pares coespecíficos (SILVA et al., 2024). De forma similar, Li e colaboradores detectaram um novo circovírus, denominado de HuCv2, em amostras de sangue de usuários de drogas intravenosas. Embora os aspectos epidemiológicos e importância clínica deste achado ainda tenham que ser esclarecidos, este trabalho destaca o risco de eventuais vírus emergentes nessa população. A descoberta do HuCV2, que é filogeneticamente relacionado ao PCV3, levanta portanto questões sobre sua origem, prevalência e patogenicidade em humanos, também apontando para outros pontos de investigação relevantes, como, por exemplo, a presença deste vírus em outros hospedeiros, sejam eles animais domésticos ou selvagens (LI et al., 2023). Nesse contexto, é ainda razoável supor que tanto o PCV3 como os

circovírus humanos recém-descobertos podem também representar um risco adicional relacionado às transfusões sanguíneas e à realização de xenotransplantes em indivíduos imunossuprimidos (OPRIESSNIG et al., 2024), além de potencialmente causarem infecções subclínicas. Neste sentido, o editorial publicado em 2024 por Silva e colaboradores ressalta as descobertas recentes como uma questão de saúde global e uma nova era na compreensão da diversidade do circovírus e seu potencial infectivo de humanos.

1.3. Estudos com o circovírus suíno como modelo

Nos experimentos realizados para a descrição e nomeação do circovírus suíno, a capacidade de replicação autônoma do circovírus foi explorada através de experimentos de transfecção com DNA purificado, nos quais o potencial infectivo do genoma do circovírus suíno foi constatado (TISCHER et al., 1982). Neste contexto, diferentes trabalhos envolvendo a transfecção do material genético do PCV têm sido executados ao longo dos anos com o intuito de esclarecer questões referentes à biologia e patologia deste vírus. Em 2001, Liu e colaboradores demonstraram que era possível gerar partículas virais infecciosas após a transfecção do genoma do PCV2 em células suínas de retina transformadas com o gene E1 do adenovírus-5 humano (HAV5) (LIU; TIKOO; BABIUK, 2001). Da mesma forma, Fenaux e colaboradores (2002) demonstraram que o DNA clonado do PCV2 é capaz de provocar sintomas clínicos e lesões patológicas quando injetado diretamente no fígado e linfonodos de porcos. Para tanto, os autores deste trabalho clonaram o genoma completo em um plasmídeo e, após excisão do material genético clonado do PCV2 e sua inserção em um novo vetor, procederam à transfecção deste material em células PK-15 para possibilitar a obtenção de uma amostra biologicamente pura e homogênea de vírus infectantes com vistas à realização de experimentos de inoculação em animais (FENAUX et al., 2002). Hattermann e colaboradores (2004), por sua vez, transfectaram o genoma religado de PCV1 e PCV2 após sua clonagem e excisão de um vetor plasmidial para investigar a possibilidade de infecção de células epiteliais e linfócitos humanos. Neste caso, o PCV1 manteve-se presente na maioria das linhagens celulares sem provocar alterações visíveis, enquanto que as células transfectadas com PCV2 exibiram um efeito citopatogênico. O DNA do PCV foi identificado nas células e no sobrenadante via PCR, e as proteínas virais foram detectadas através de imunofluorescência indireta. Os autores ainda demonstraram que os vírus não foram capazes de infectar células

livres do vírus e que, embora tenha ocorrido a expressão gênica e replicação do PCV em células humanas, a infecção não se mostrou produtiva (HATTERMANN et al., 2004).

Dezen e colaboradores (2010) descreveram também o uso da técnica de MPRCA (*multiply-primed rolling-circle amplification*) para a amplificação de genomas do PCV2 que, posteriormente, também foram utilizados em ensaios de transfecção envolvendo células PK-15. Aqui, o material amplificado foi inserido em vetor de clonagem e, em seguida, circularizado após reações de restrição e ligação. Esse processo permitiu a construção de clones infecciosos de PCV2 a partir de genomas amplificados. (DEZEN et al., 2010). Já em 2011, Chen e colaboradores realizaram um estudo baseado na produção de diferentes plasmídeos contendo as ORFS 1, 2, 3, 4 e 5 do PCV2, fusionadas à proteína EGFP, que, então, foram transfectados diretamente em células PK-15. Este estudo forneceu *insights* sobre a replicação e patogênese do PCV2, o que permitiu estudos aprofundados sobre a biologia do vírus (CHEN et al., 2011). Já o trabalho realizado por Walia e colaboradores (2014), por outro lado, envolveu apenas a clonagem da ORF2 do PCV2a e PCV2b em vetores eucarióticos de expressão contendo um promotor sob controle do citomegalovírus humano (CMV) e a transfecção destes vetores em células PK-15, de modo a verificar o efeito apoptótico das proteínas Cap dos subtipos virais citados e de versões truncadas da mesma proteína sem a sequência N-terminal de localização nuclear (NLS). Neste trabalho foi visto que a proteína Cap pode desencadear diferentes vias de sinalização envolvidas na morte celular (WALIA et al., 2014). No mesmo ano do trabalho anterior, Li e colaboradores (2014) realizaram ensaios visando o aumento da eficiência da transfecção de um clone de um DNA quimérico infeccioso construído com material genético proveniente de PCV1 e PCV2. Para tanto, os genomas completos dos dois tipos de PCV foram inseridos em um plasmídeo utilizado nos experimentos de transfecção com células Dulac e PK-15 (LI et al., 2014).

Palinski e colaboradores realizaram em 2017 o sequenciamento metagenômico de amostras de tecido fetal e de lesões presentes em suínos com sinais de PDNS (*porcine dermatitis and nephropathy syndrome*) e desenvolveram um novo método de qPCR para a identificação do gene codante para a síntese da proteína do capsídeo do PCV3. Os autores produziram um plasmídeo contendo a sequência completa da proteína Cap e transfectaram este material em células HEK293. Estas células então foram utilizadas para caracterizar a ligação de anticorpos específicos contra a proteína cap do PCV3, que não reagiram frente a amostras infectadas com o PCV2 (PALINSKI et al., 2017). No mesmo ano, Cai e colaboradores (2017) desenvolveram um método para a produção de títulos elevados de

PCV2 com base na infecção de células PK-15 por baculovírus recombinantes contendo o genoma viral. Este método, de acordo com os resultados mostrados pelos autores, demonstrou-se mais eficaz que a transfecção química de outros plasmídeos utilizando o mesmo tipo de cultivo celular (CAI et al., 2017). Por outro lado, Hansoongnern e colaboradores (2022) também utilizaram um sistema baseado em baculovírus para a produção de VLPs (*virus-like particles*) do PCV2. Neste trabalho, a ORF2 completa do PCV2 foi amplificada a partir de uma amostra de sangue de um suíno infectado e inserida em um vetor. O plasmídeo resultante teve, então, excisada a ORF2 clonada para inserção em um vetor de transferência utilizado para a produção de bacmídeos recombinantes, que foram posteriormente transfectados em células Sf9 (HANSOONGNERN et al., 2022). Finalmente, Feng e colaboradores (2022), com o objetivo de investigar o papel da recombinação do PCV2 na replicação e efeitos biológicos deste vírus, construíram plasmídeos com as sequências de dois PCV2s recombinantes (rPCV2s) com sequências genômicas de, respectivamente, 358 e 1125 nucleotídeos de comprimento. Estes plasmídeos foram então transfectados em células PK-15 e 3D4/21 e permitiram pela primeira vez a recuperação *in vitro* de um agente viral originado por meio de rearranjo intragenômico (rPCV2 com 1125 nucleotídeos). Os autores também demonstraram neste trabalho que os genomas recombinantes permitiram um aumento significativo da replicação *in vitro* do PCV2, que em parte foi explicado pela mudança do ambiente redox das células infectadas causada pelo estresse oxidativo relacionado à presença do agente viral recombinante com 1125 nucleotídeos (FENG et al., 2022).

Desta forma, como apresentado, estudos de transfecção envolvendo o PCV foram conduzidos por diversos autores com diferentes metodologias e finalidades. No contexto do presente estudo, a produção experimental de partículas virais permitirá investigações futuras mais aprofundadas sobre a montagem e estabilidade do capsídeo viral. A construção do genoma viral sintético permite determinar a sequência de aminoácidos que comporão a sequência proteica (Figura 5), com isso é possibilitada a obtenção de partículas virais com diferentes composições de aminoácidos na proteína fundamental constituinte do capsídeo (Cap). Simulações computacionais realizadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Figura 6) elucidaram resíduos de aminoácidos importantes, ou mesmo essenciais, para a construção do capsídeo do PCV2b e, possivelmente, para suas propriedades imunogênicas e antigênicas. Tudo isso leva, finalmente, ao potencial desenvolvimento futuro de novas vacinas e outros produtos biotecnológicos. Como destacado na Tabela 1, existem atualmente algumas vacinas disponíveis comercialmente cujos antígenos são baseados em partículas virais ou

proteínas Cap recombinantes. Nesse sentido, é possível considerar a produção de novas vacinas com alterações relevantes na composição da proteína Cap de seus antígenos.

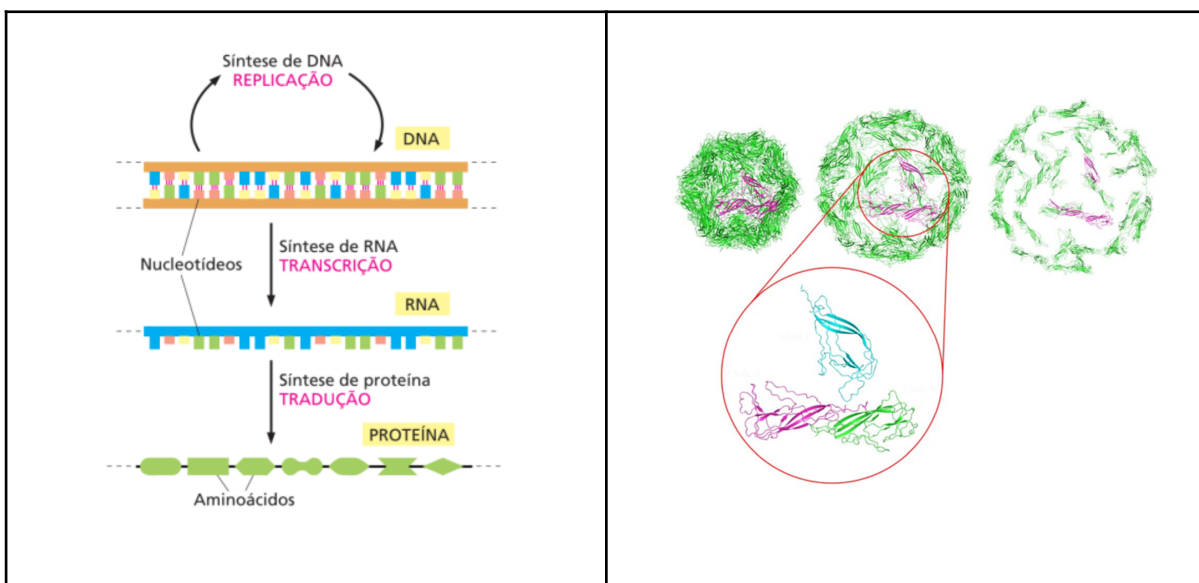


Figura 5. Dogma Central da Biologia Molecular. Representação esquemática do dogma central da biologia molecular, onde o DNA pode ser replicado para geração de mais cópias de sua estrutura, como também transcrito em RNA e, posteriormente, traduzido em resíduos de aminoácidos que compõem uma sequência proteica.

Fonte: Alberts (2017).

Figura 6. Expansão radial do capsídeo do PCV2b. Representação esquemática do capsídeo do PCV2b expandido com destaque para resíduos de aminoácidos com interações hidrofílicas (proteínas rosa e verde) e hidrofóbicas (proteína azul com as demais) importantes para a montagem e estabilidade do capsídeo viral.

Fonte: Acervo pessoal. Ilustração gerada pelo programa PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System*).

Tabela 1. Vacinas comerciais atualmente disponíveis para PCV2 (adaptado de MAITY et al., 2023).

Vacina	Antígeno	Recomendação
Circovac®	PCV2a inativado (vírus completo)	Fêmeas em idade reprodutiva
Fostera® PCV	PCV1-2a inativado (vírus quimérico)	Leitões (≥3 semanas de idade)
Ingelvac CircoFLEX®	Proteína Cap de PCV2a (recombinante)	Leitões (≥2 semanas de idade)
Circumvent® PCV	Proteína Cap de PCV2a (recombinante)	Leitões (≥3 semanas de idade)
Porcilis® PCV	Proteína Cap de PCV2a (recombinante)	Leitões (≥3 semanas de idade)

1.4. Técnicas em Biologia Molecular

Certamente, a simplicidade genômica e estrutural do circovírus suíno, bem como a sua capacidade de replicação autônoma, o tornam um excelente alvo para estudos biotecnológicos que possam contribuir de forma significativa para inovações diagnósticas e terapêuticas. Para tanto, diversas técnicas experimentais para a clonagem e obtenção de quantidades adequadas do genoma sintético do PCV2b e posteriores experimentos de transfecção foram conduzidos a fim de induzir a montagem de partículas virais de forma controlada e eficaz. Além disso, uma abordagem abrangente foi empregada para a validação de cada etapa. Subsequentemente, um breve contexto das técnicas adotadas no projeto é exposto.

A clonagem molecular, desenvolvida por Herbert Boyer, Stanley Cohen e Paul Berg em colaboração com suas equipes nas Universidades de Stanford e da Califórnia em São Francisco, abrange diversas técnicas que permitem a produção ilimitada de cópias de DNA ou RNA na forma pura. Isso é alcançado por meio do corte do DNA cromossômico ou amplificado a partir do uso de enzimas de restrição, inserção dos fragmentos resultantes em elementos genéticos auto replicantes, como vetores plasmídicos, a multiplicação desses clones em células bacterianas e posterior recuperação dos mesmos. Essas avançadas técnicas de engenharia genética têm amplas aplicações, desde a determinação de sequências genéticas e redes reguladoras da expressão eucariótica até a produção em larga escala de proteínas para pesquisa e uso médico, incluindo a fabricação de hormônios e vacinas (ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J., 2002). A tecnologia do DNA recombinante proporcionou meios para o isolamento de sequências específicas, redesenho das mesmas e reinserção em células, o que revolucionou o estudo das células vivas (GEORGE; HIERHOLZER; ADES, 1996).

As endonucleases de restrição são enzimas produzidas por bactérias para degradar o DNA invasor. Diferentes enzimas podem ser isoladas de várias bactérias, as quais cortam a dupla hélice do DNA em locais específicos determinados por sequências de 4 a 8 nucleotídeos. Essas mesmas sequências, quando presentes no genoma da bactéria, são protegidas da clivagem por metilação, enquanto as sequências no DNA viral invasor normalmente não são metiladas e, assim, são clivadas. As clivagens podem gerar extremidades coesivas ou extremidades cegas (ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J., 2002).

A DNA ligase é a enzima responsável por catalisar a ligação entre um grupo fosfato PO_4^{3-} 5' de uma extremidade e a hidroxila OH 3' de outra extremidade de uma molécula de DNA de fita dupla, selando-a. Esse processo envolve uma cascata de diversas reações, é dependente de energia, e a fonte pode variar de acordo com a classe de DNA ligase envolvida (moléculas como AMP, ATP ou NAD^+): a T_4 DNA ligase utiliza moléculas de ATP. Além disso, essa enzima também depende de cofatores metálicos divalentes (geralmente Mg^{2+}) para desempenhar adequadamente sua função (LOHMAN; TABOR; NICHOLS, 2011). O processo é basicamente dividido em três passos principais (Figura 7): Primeiramente a DNA ligase forma um complexo com ATP, resultando no complexo enzima-AMP. Então o AMP conjugado a enzima se liga ao fosfato 5' já existente na cadeia, o que ativa essa extremidade para o ataque nucleofílico pela hidroxila da outra extremidade. Assim a ligação fosfodiéster é formada e os fragmentos são selados, após, a enzima desprende da fita de DNA (JOHNSON; O'DONNELL, 2005). As reações enzimáticas de digestão e ligação desempenham funções biológicas essenciais, além disso, essas enzimas também têm um alto valor na aplicação biotecnológica, permitindo diversos tipos de análises.

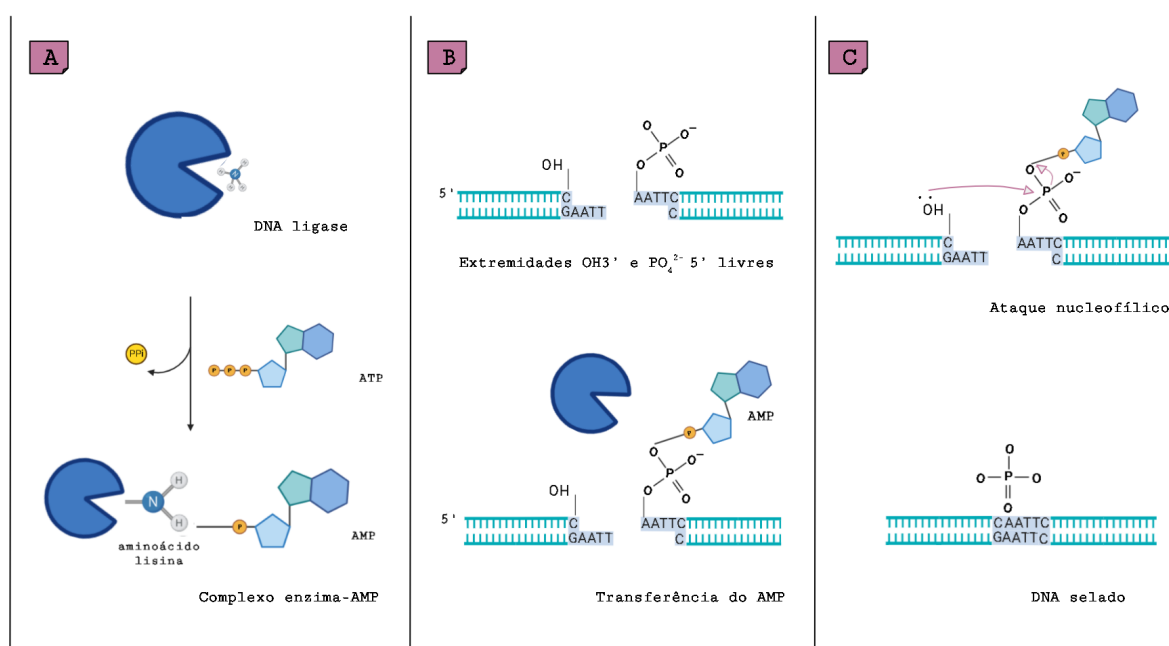


Figura 7. Etapas da reação de ligação catalisada pela DNA ligase. A. A enzima DNA ligase possui uma lisina em seu sítio ativo. É através do grupo amino (NH_3) desse aminoácido que o complexo enzima-AMP é formado. Esta reação requer energia livre obtida pela hidrólise de ATP em AMP e fosfatos inorgânicos. B. O AMP conjugado é transferido da enzima para a terminação fosfato 5' (PO_4^{2-}) livre de DNA. C. A presença de AMP na terminação 5' proporciona condições para que o $\text{OH}3'$ realize um ataque nucleofílico no fosfato 5' para formação da ligação fosfodiéster e, consequentemente, do segmento de DNA.

Fonte: Acervo pessoal. Ilustração gerada na plataforma *Bio Render*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método que permite a síntese de sequências específicas de DNA. Esse procedimento envolve ciclos repetitivos de desnaturação, hibridização de oligonucleotídeos (*primers*) e extensão por meio da enzima polimerase. O resultado é um aumento exponencial na quantidade do fragmento definido pelas posições das extremidades 5' dos dois iniciadores no alvo de DNA a cada ciclo. Essa técnica pode ser repetida por muitos ciclos e é altamente específica. Além disso, permite a adição de informações a uma ou ambas as extremidades da sequência durante o processo de amplificação, bem como a construção de uma sequência inteiramente a partir de fragmentos sintéticos (MULLIS et al., 1986). Essa inovação rendeu a Kary Mullis o Prêmio Nobel de Química em 1993. Embora Mullis seja amplamente creditado com a ideia original do PCR, seu desenvolvimento bem-sucedido envolveu contribuições significativas de colegas na *Cetus Corporation* e a descoberta de uma enzima termoestável em uma bactéria termofílica. Isso permitiu a amplificação de DNA com maior eficiência e especificidade. A técnica inicialmente usou uma enzima polimerase extraída da *Escherichia coli*, mas a descoberta da enzima Taq oriunda da *Thermophilus aquaticus* revolucionou o processo, permitindo a automação por meio de termocicladores. O PCR se destacou por sua notável versatilidade, criando novas possibilidades para sua aplicação em diversas situações na pesquisa e na prática laboratorial (BARTLETT; STIRLING, 2003).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi introduzida em 1992 por Higuchi e colaboradores. A técnica emprega agentes fluorescentes para monitorar a reação de amplificação. O nível de fluorescência aumenta de maneira proporcional ao aumento do número de cópias do alvo na reação. Há dois principais tipos de agentes fluorescentes empregados nessa técnica: os intercalantes de DNA e as sondas fluorescentes (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2014). As sondas são oligonucleotídeos projetados especificamente para a sequência alvo. Elas possuem fluoróforo em uma de suas extremidades, e um *quencher* (que absorve a fluorescência devido à proximidade com o fluoróforo) na outra. Uma vez que as sondas são desenhadas para se anelarem no meio da sequência alvo, durante a amplificação, a atividade exonuclease 5'-3' da enzima Taq cliva a sonda, permitindo a emissão de fluorescência devido a separação física do *quencher* com o fluoróforo (KUBISTA et al., 2006).

A análise por qPCR pode ser conduzida de modo qualitativo ou quantitativo. As análises qualitativas buscam apenas a detecção de fluorescência a partir de *primers* e/ou sondas específicas a sequência alvo. As análises quantitativas podem ser empregadas de duas

formas diferentes: relativa e absoluta. As análises relativas podem ser baseadas em uma curva padrão ou pela comparação de Cts. Para realizar a qPCR, são necessários equipamentos especializados com filtros detectores que leem a fluorescência, e uma fonte de luz com comprimentos de onda adequados para excitar a fluorescência (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2014). A análise relativa com comparação do ciclo *threshold* ou ciclo de quantificação (Ct ou Cq) estabelece a proporção entre o número de cópias do alvo entre as amostras. A qPCR é um processo de amplificação exponencial, o que significa que a quantidade de produto de DNA duplica a cada ciclo. Portanto, com cada diminuição de um ciclo no valor de Ct, a quantidade de cópias do alvo duplica. Este método de análise relativa é valioso para comparar a quantidade relativa do alvo entre diferentes amostras, como em experimentos de expressão gênica, por exemplo. Os intercalantes são inespecíficos e se ligam a toda a fita dupla do DNA. Com isso, a análise do perfil de dissociação do DNA é essencial para verificação da especificidade da reação (KUBISTA et al., 2006). A análise relativa por meio da curva padrão envolve a quantificação a partir de uma amostra com concentração previamente conhecida, que é diluída e quantificada na reação a fim de criar padrões que estabelecem a relação entre o valor de Cq obtido e a quantidade de cópias. Ao comparar o valor de Cq da amostra desconhecida com o da curva padrão, é possível quantificá-la (MACKAY, 2002).

O sequenciamento de DNA possibilita a determinação da ordem das bases nitrogenadas em uma cadeia específica de DNA. O método de Sanger, desenvolvido por Frederick Sanger e colaboradores em 1977, é uma das abordagens clássicas para o sequenciamento de DNA. Este método baseia-se no uso de reações de PCR para replicar o DNA-alvo. Nestas reações, são empregados dois tipos de nucleotídeos: nucleotídeos comuns (deoxinucleotídeos) e nucleotídeos modificados (dideoxinucleotídeos), que são marcados com agentes fluorescentes. A característica especial desses nucleotídeos modificados é a ausência do grupo hidroxila 3' na pentose, o que impede a formação da ligação fosfodiéster com a próxima base na cadeia, impossibilitando assim a incorporação de outros nucleotídeos. Durante a replicação do DNA nas reações de PCR, os dideoxinucleotídeos marcados são incorporados na nova cadeia sintetizada. No entanto, quando esses nucleotídeos alcançam a extremidade da cadeia, a falta do grupo hidroxila 3' impede a adição de mais nucleotídeos. Como resultado, são gerados produtos de diferentes tamanhos. Após a realização da PCR com esses nucleotídeos marcados, as cadeias de DNA resultantes são separadas de acordo com o

tamanho, e a marcação específica em cada uma das bases permite a leitura e a determinação da sequência das bases nitrogenadas (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

A maioria das linhagens celulares de vertebrados possui um número limitado de divisões possíveis em cultura celular, no entanto, ocasionalmente, podem surgir variantes imortais que são capazes de ser mantidas indefinidamente como linhagens celulares. O isolamento e a immortalização das células de linhagem de testículo suíno remontam à década de 1960, quando foram inicialmente aplicadas em estudos relacionados à Gastroenterite transmissível em suínos. A cultura contínua dessas células, conhecidas como células ST, teve início a partir de tecido testicular tripsinizado de fetos suínos. Essas células são aderentes, exibem morfologia semelhante à de fibroblastos e adquiriram imortalidade de forma espontânea (MCCLURKIN; NORMAN, 1966).

A técnica de transfecção celular envolve a introdução de ácidos nucleicos distintos daqueles que compõem o repertório original da célula transfectada e possibilita, desta forma, o estudo da função de genes e produtos gênicos em geral em diferentes tipos de células (KIM; EBERWINE, 2010). Existem várias estratégias disponíveis para a entrega de DNA em células eucarióticas, e essas técnicas podem ser classificadas em três categorias: transfecção por métodos bioquímicos, transfecção por métodos físicos e transdução mediada por vírus. A escolha de um método de transfecção específico é determinada pelo objetivo experimental, como o tipo de ensaio a ser usado para triagem, a capacidade da linhagem celular de sobreviver ao estresse da transfecção e a eficiência necessária do sistema. O uso bem-sucedido de reagentes lipídicos catiônicos, como lipossomas, ampliou as possibilidades de entrega de genes em diversos tipos celulares. Isso ocorre porque os lipídios catiônicos interagem espontaneamente com o DNA, formando uma concha unilamelar que se funde com as membranas celulares. Essa formação de complexos DNA-lipídio é mediada por interações iônicas entre os grupos principais dos lipídios, que têm uma carga positiva significativa que neutraliza os grupos fosfato carregados negativamente presentes no DNA (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A microscopia eletrônica, inventada na década de 1930, utiliza feixes de elétrons propagados no vácuo para possibilitar a visualização da estrutura celular em detalhes, alcançando uma escala nanométrica com um aumento de até um milhão de vezes. No entanto, a capacidade de penetração desses elétrons é limitada, e para melhorar a visualização, técnicas de contraste com uso de metais pesados densos de elétrons são necessárias (ALBERTS et al.,

2017). Uma dessas técnicas é a de contraste negativo, que envolve o revestimento de partículas em suspensão com um meio eletrondenso. Essa técnica é aplicável a uma variedade de elementos, incluindo partículas virais, bactérias, macromoléculas e vesículas de membrana celular (GEORGE; HIERHOLZER; ADES, 1996). A técnica de coloração negativa, desenvolvida por Brenner & Horne (1959), é valorizada pela sua simplicidade e rapidez na preparação da amostra, permitindo a visualização da morfologia e do diâmetro viral (UEDA et al., 1995).

5. CONCLUSÃO

A construção do genoma viral sintético foi bem sucedida, como indicado pelos resultados dos testes de sequenciamento e ensaios de qPCR da ligação e do plasmídeo, confirmando a integridade do genoma sintético.

Os ensaios de transfecção com o vetor contendo a sequência da proteína GFP revelaram que as células ST não são refratárias à introdução do DNA exógeno e aceitam quantidades inferiores às recomendadas pelo protocolo de transfecção.

O DNA viral foi detectado em alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo, tanto no sobrenadante de células submetidas aos ensaios de transfecção quanto nas de infecção, indicando uma ampla disseminação do material genético viral nas culturas celulares. A quantificação da carga viral mostrou uma correlação direta com a densidade celular, sugerindo uma replicação viral ativa conforme o crescimento celular era estimulado e acomodado, e mais proteínas da fase S celular ficavam disponíveis para a replicação viral. Não foram detectadas diferenças significativas entre a transfecção realizada com ssDNA circular e dsDNA circular.

A presença da proteína Cap foi confirmada por ELISA, tanto no sobrenadante de cultivo celular de células submetidas aos ensaios de transfecção quanto aos ensaios de infecção, indicando a integridade e funcionalidade das partículas virais infectantes geradas nas culturas celulares nas condições experimentais estabelecidas.

A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão com coloração negativa permitiu a visualização direta da morfologia e tamanho das partículas virais sintéticas, revelando características moleculares típicas do circovírus.

Os resultados desses experimentos fornecem fortes indícios de que a produção experimental de partículas virais infectantes do PCV2b em células ST a partir de genomas sintéticos foi bem sucedida e estabelece um protocolo validado para investigações futuras, que poderão possibilitar não apenas o estudo de questões relacionadas a montagem e estabilidade do capsídeo do circovírus suíno, mas também nortear o desenvolvimento de futuras vacinas ou outros produtos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos de Biologia Celular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- BAO, F. et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 432–440, abr. 2018.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Em: **PCR Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 3–6.
- BIAGINI, P. Human circoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 95–101, 4 fev. 2004.
- BREITBART, M. et al. Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Circoviridae Chapter Circoviridae Citation. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 1997–1998, 2017.
- BRENNER, S.; HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 34, p. 103–110, 1959.
- CASTRO, A. M. M. G. DE et al. CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 281–291, jul. 2007.
- CHANG, A. Y. et al. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. **Undergraduate Methods Paper**, v. 1, p. 22–25, 13 jul. 2017.
- CHEN, H. C. G. et al. The studies on the transfection of EGFP-fused porcine circovirus Type 2 genome. **The Journal of veterinary medical science**, v. 73, n. 8, p. 1097–1100, 2011.
- Circovirus ~ ViralZone. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/118?outline=all_by_species>. Acesso em: 15 maio. 2024.
- CRUZ, T.F. et al. A double-antibody sandwich ELISA based on the porcine circovirus type 2 (PCV2) propagated in cell culture for antibody detection. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p.1171-1177, 2016.
- CRUZ, T. F. Quantificação do circovírus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões. 2006.
- DEZEN, D. et al. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 436–440, jun. 2010.

FAUREZ, F. et al. Replication of porcine circoviruses. **Virology Journal**, 2009.

FENAUX, M. et al. Cloned Genomic DNA of Type 2 Porcine Circovirus Is Infectious When Injected Directly into the Liver and Lymph Nodes of Pigs: Characterization of Clinical Disease, Virus Distribution, and Pathologic Lesions. **Journal of Virology**, v. 76, n. 2, p. 541–551, 15 jan. 2002.

FENG, H. et al. A Novel Virus-Like Agent Originated From Genome Rearrangement of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Enhances PCV2 Replication and Regulates Intracellular Redox Status In Vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 13 abr. 2022.

FENG, S.; SCHREYER, A.; KHAYAT, R. Receptor Recognition by Porcine Circovirus 2. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. S3, p. 1108–1109, 25 jul. 2016.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2012.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 8, n. 1, 11 fev. 2014.

GEORGE, V. G.; HIERHOLZER, J. C.; ADES, E. W. **Virology Methods Manual**. [s.l.] Elsevier, 1996.

GILLILAND, S. M. et al. Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. **Biologicals**, v. 40, n. 4, p. 270–277, jul. 2012.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, out. 2008.

GUO, L. J. et al. Porcine Circovirus type 2 (PCV2); genetic variation and newly emerging genotypes in China. **Virology Journal**, v. 7; p. 273-284; 2010.

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.

HANSOONGNERN, P. et al. Encapsidated-CpG ODN enhances immunogenicity of porcine circovirus type 2 virus-like particles. **Veterinary microbiology**, v. 275, p. 109583, dez. 2022.

HARMON, K.M. et al. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States. **Genome Announcements**; 3(6), 2015.

HATTERMANN, K. et al. Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. **Xenotransplantation**, v. 11, n. 3, p. 284–294, maio 2004.

JOHNSON, A.; O'DONNELL, M. DNA Ligase: Getting a Grip to Seal the Deal. **Current Biology**, v. 15, n. 3, p. R90–R92, fev. 2005.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, jun. 2012.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173, ago. 2010.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 1 abr. 2006.

LADEKJÆR-MIKKELSEN, A. S. et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 97–114, 22 out. 2002.

LEMOS, E. R. S. et al. **Tópicos em Virologia**. [s.l.] Editora Fiocruz, 2023.

LI, J. et al. Optimal transfection methods and comparison of PK-15 and Dulac cells for rescue of chimeric porcine circovirus type 1-2. **Journal of Virological Methods**, v. 208, p. 90–95, 1 nov. 2014.

LI, Y. et al. Novel Circovirus in Blood from Intravenous Drug Users, Yunnan, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1015–1019, 1 maio 2023.

LIU, Q.; TIKOO, S. K.; BABIUK, L. A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 285, n. 1, p. 91–99, 20 jun. 2001.

LIU, X. et al. Human cells are permissive for the productive infection of porcine circovirus type 2 in vitro. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LOHMAN, G. J. S.; TABOR, S.; NICHOLS, N. M. DNA Ligases. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 94, n. 1, abr. 2011.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 15 mar. 2002.

MAITY, H. K. et al. Revisiting Porcine Circovirus Infection: Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector. **Vaccines**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 ago. 2023.

MCCLURKIN, A. W.; NORMAN, J. O. Studies on Transmissible Gastroenteritis of Swine I. Selected Characteristics of a Cytopathogenic Virus Common to Five Isolates from Transmissible Gastroenteritis. **Con. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v. 30, p. 190–198, jul. 1966.

MEEHAN, B. M. et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2171–2179, 1998.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1. ed. [s.l.: s.n.].

MISINZO, G. et al. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 7, p. 2057–2068, jul. 2005.

MULLIS, K. et al. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, n. 0, p. 263–273, 1 jan. 1986.

OPRIESSNIG, T. et al. Emergence of novel circoviruses in humans and pigs and their possible importance for xenotransplantation and blood transfusions. **Xenotransplantation**, v. 31, n. 2, 1 mar. 2024.

OPRIESSNIG, T. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. **Veterinary research**, v. 41, n. 3, p. 31, 18 maio 2010.

PALINSKI, R. et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, 1 jan. 2017.

PHAN, T. G. et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 11 nov. 2016.

RODRIGUES, C. P. et al. **Temporal variation study of the prevalence of porcine circovirus species and their genotypes (PCV-2A, PCV-2B, AND PCV-2D-2) in Brazil from 2009 to 2017**. Porto Alegre: [s.n.]. Disponível em: <[https://www.even3.com.br/anais/cbv/297689-TEMPORAL-VARIATION-STUDY-OF-THE-PREVALENCE-OF-PORCINE-CIRCOVIRUS-SPECIES-AND-THEIR-GENOTYPES-\(PCV-2A-PCV-2B-AND-2D-2\)-IN-BRAZIL-FROM-2009-TO-2017](https://www.even3.com.br/anais/cbv/297689-TEMPORAL-VARIATION-STUDY-OF-THE-PREVALENCE-OF-PORCINE-CIRCOVIRUS-SPECIES-AND-THEIR-GENOTYPES-(PCV-2A-PCV-2B-AND-2D-2)-IN-BRAZIL-FROM-2009-TO-2017)>. Acesso em: 14 out. 2023.

RODRIGUEZ, C. et al. Unknown Circovirus in Immunosuppressed Patient with Hepatitis, France, 2022. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1051–1054, 1 maio 2023.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and Staging of Hepatic Damage in Pigs Naturally Infected with Porcine Circovirus Type 2. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 687–692, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3. ed. Nova York: [s.n.]. v. 1

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SEGALÉS, J. et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**, v. 162, n. 26, p. 867–868, 28 jun. 2008.

SILVA, M. K. DA et al. A newly discovered circovirus and its potential impact on human health and Disease-editorial. **International Journal of Surgery**, 16 fev. 2024.

TISCHER, I. et al. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Archives Virology**, v. 96, p. 39–57, 18 mar. 1987.

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

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl Bakteriol Orig A.**, v. 226, n. 2, p. 153–67, fev. 1974.

UEDA, M. et al. Rapid virus diagnosis by electron microscopy. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.55, n.2, p. 57-65, 1995.

VEDOVELI, N. C. P. S.; CASTRO, V. P. **Manual para a construção de vetores de expressão**. R./Virgínia Picanço e Castro– Ribeirão Preto: FUNDHERP. 2016. 42p. ISBN: 978-85-92708-00-9.

VICTORIA, J. G. et al. Viral Nucleic Acids in Live-Attenuated Vaccines: Detection of Minority Variants and an Adventitious Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 12, p. 6033–6040, 15 jun. 2010.

WALIA, R. et al. Porcine circovirus-2 capsid protein induces cell death in PK15 cells. **Virology**, v. 468–470, p. 126–132, 1 nov. 2014.

WANG, Y. et al. Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016-2018. **Transboundary and emerging diseases**, v. 67, n. 3, p. 1284–1294, 1 maio 2020.

WIEDERKEHR, D. D. et al. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1–2, p. 27–35, abr. 2009.

WEI, R. et al. Changes on the viral capsid surface during the evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) from 2009 till 2018 may lead to a better receptor binding. **Virus Evolution**, v. 5, n. 2, 1 jul. 2019.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Newcastle disease, 2020. Disponível em: <https://www.woah.org/en/document/circoviruses-infection-with-2/>. Acesso em: 25 maio 2024.

XIAO, C.T. et al. 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.

ZHANG, H. et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as *Porcine circovirus 4*, Hunan province, China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 3, p. 1057–1061, 24 maio 2020.