

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).

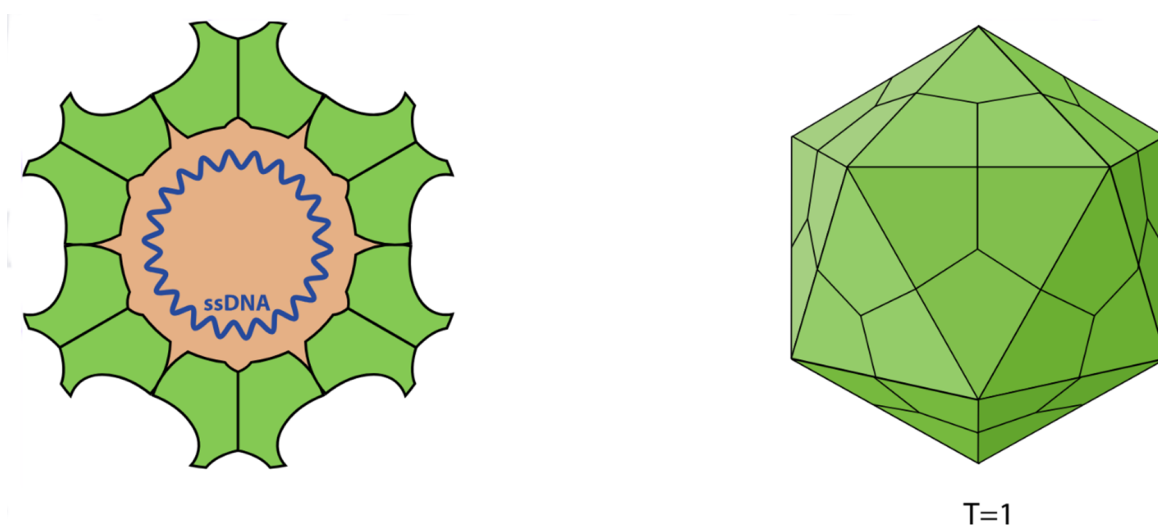


Figura 1. Estrutura dos Circovírus. Representação esquemática da estrutura dos circovírus, onde o DNA circular fita simples (ssDNA) está representado em azul e o capsídeo está representado em verde. O capsídeo é composto por 60 unidades assimétricas (T=1) de uma única proteína (Cap).
Fonte: Viralzone.

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).

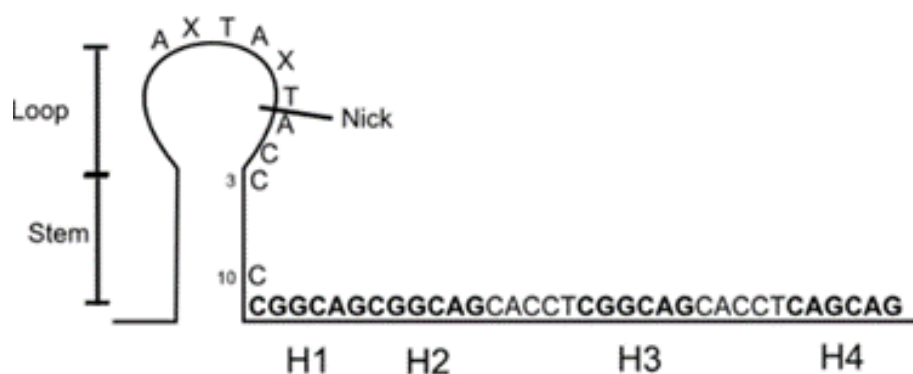


Figura 2. Origem de replicação do PCV. Origem de replicação composta por uma estrutura em forma de haste (*Stem-loop*) que inclui uma sequência octanucleotídica cercada por palíndromos. H1: Hexâmero 1; H2: Hexâmero 2; H3: Hexâmero 3; H4: Hexâmero 4. Pentâmeros CACCT.

Fonte: Adaptado de FAUREZ et al., 2009.

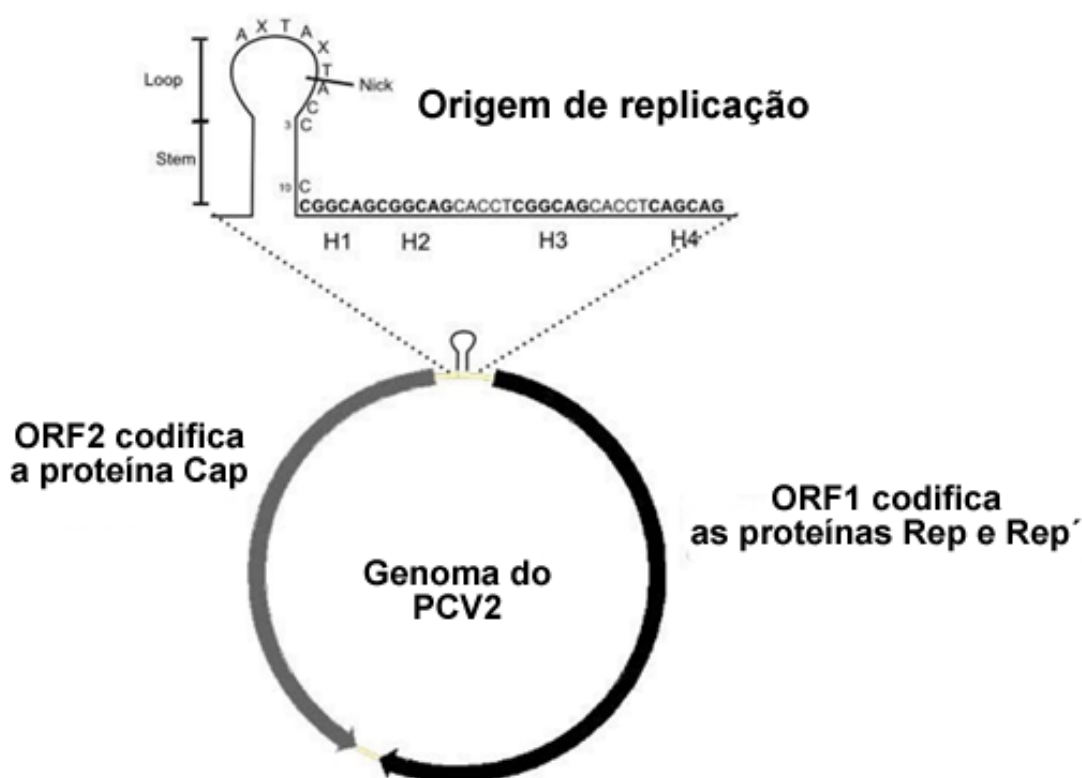


Figura 3. Representação do genoma do PCV. Seta preta: Região aberta de leitura 1 (ORF1), localizada na fita positiva, que codifica as proteínas Rep e Rep'. Seta cinza: Região aberta de leitura 2 (ORF2), localizada na fita negativa, que codifica a proteína do capsídeo. Entre as ORF1 e ORF2 estão as regiões 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).

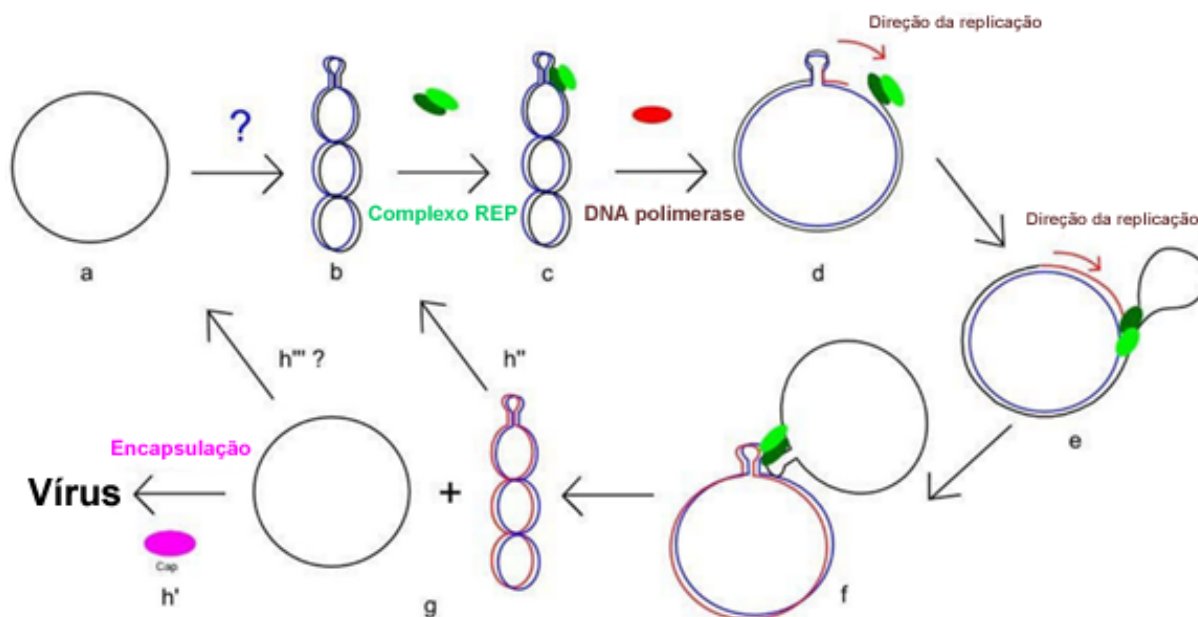


Figura 4. Modelo de replicação de círculo rolante de vírus de fita simples. Fita preta: fita parental positiva e genoma viral. Fita azul: fita negativa gerada da duplicação inicial do ssDNA circular. Fita vermelha: fio condutor positivo, funciona como *primer* para a DNA polimerase. **a** e **b**: a 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.

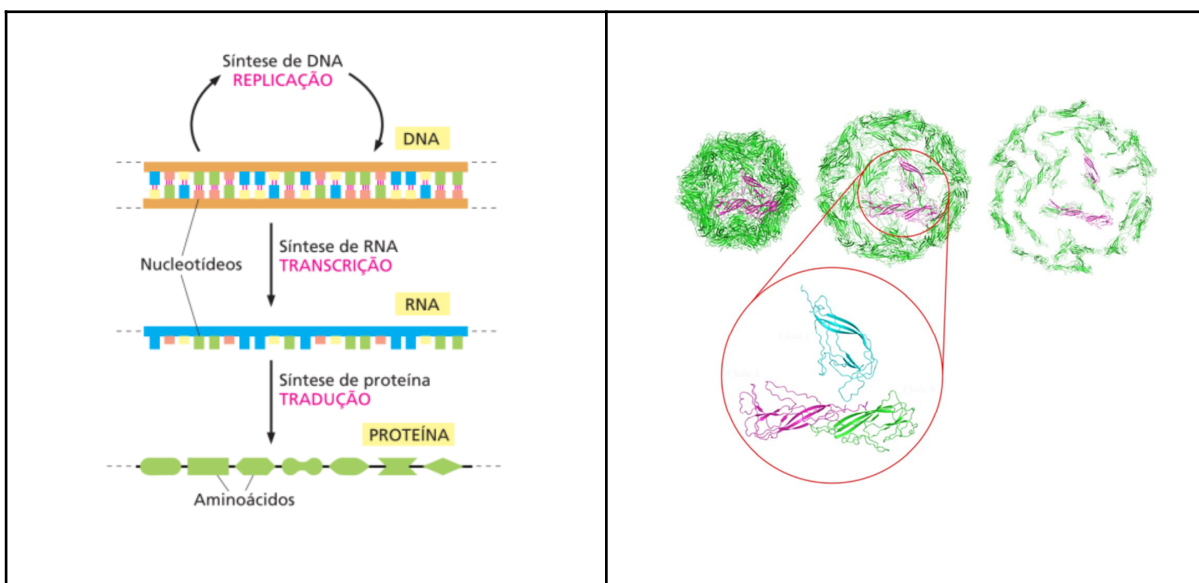


Figura 5. Dogma Central da Biologia Molecular. Representação esquemática do dogma central da biologia molecular, onde o DNA pode ser replicado para geração de mais cópias de sua estrutura, como também transcrito em RNA e, posteriormente, traduzido em resíduos de aminoácidos que compõem uma sequência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

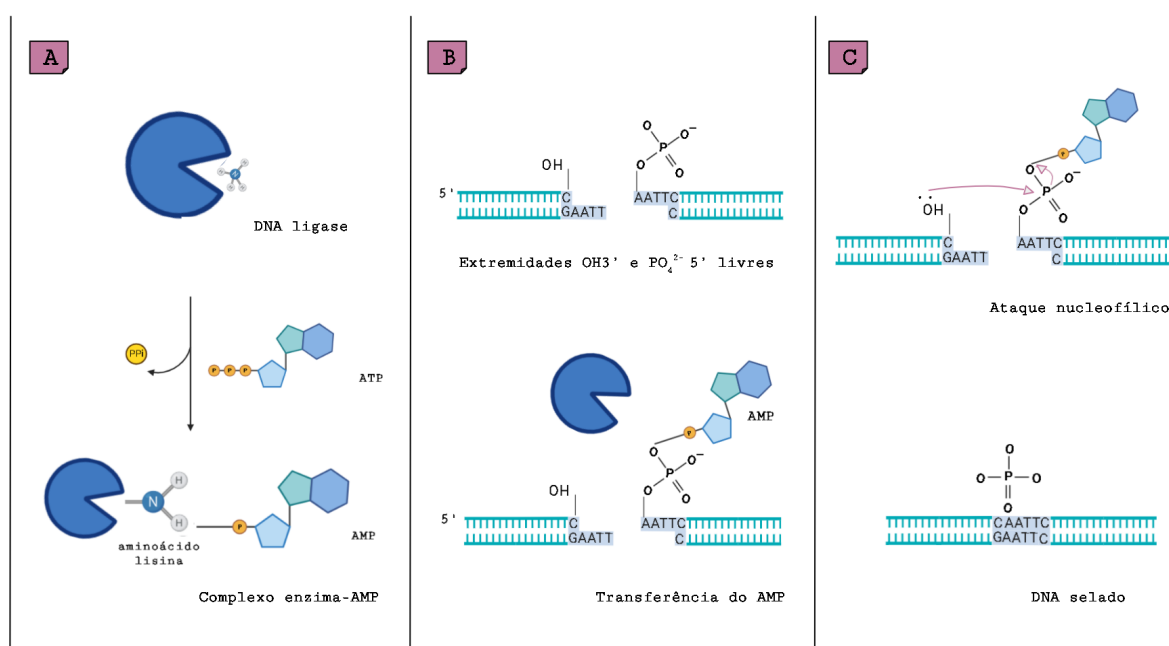


Figura 7. Etapas da reação de ligação catalisada pela DNA ligase. A. A enzima DNA ligase possui uma lisina em seu sítio ativo. É através do grupo amino (NH_3) desse aminoácido que o complexo enzima-AMP é formado. Esta reação requer energia livre obtida pela hidrólise de ATP em AMP e fosfatos inorgânicos. 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 OH3' 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).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi padronizar procedimentos para a construção do genoma viral artificial e a subsequente formação de partículas virais infectantes por meio da transfecção em cultura de células de linhagem de testículo suíno (células ST).

2.2. Objetivos específicos

Objetivo Específico 1. Elaborar um conjunto abrangente de diretrizes e protocolos que visam estabelecer uma padronização rigorosa nas etapas de construção e transfecção de genomas artificiais do PCV2b em culturas celulares.

Objetivo Específico 2. Realizar experimentos *in vitro* de transfecção do genoma artificial do PCV2b e avaliar a produção *in vitro* de DNA, da proteína do capsídeo (proteína Cap) e partículas virais infectantes. Esta etapa do trabalho tem como meta validar experimentalmente a formação de partículas virais em células transfectadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Genotipagem e sequenciamento do genoma viral selvagem

A amostra de soro utilizada neste projeto foi obtida a partir de amostras de campo submetidas ao diagnóstico de circovírus no IBTEC (Instituto de Biotecnologia – Unesp/Botucatu). A seleção da amostra foi baseada em seu genótipo (2b), e posteriormente, a sequência foi determinada através do método Sanger.

A genotipagem foi feita por meio da reação de qPCR com utilização de sondas marcadas com o fluoróforo FAM. As sondas utilizadas foram baseadas em trabalhos anteriores (OPRIESSNIG et al., 2010; RODRIGUES et al., 2020). Nestas reações foram utilizados 10 µL de *GoTaq Probe (Promega®)*, *primers* senso e antisenso com concentração final de 400 nM, sondas com uma concentração final de 150 nM, 4 µL de amostras contendo DNA viral (10 pmol/µL) e água livre de nucleases para completar o volume final de 20 µL. O programa de termociclagem utilizado apresentou a seguinte ordem: 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

O sequenciamento Sanger foi feito com uso do *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems®)* empregado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se os *primers forward* ou *reverse*. A leitura do sequenciamento foi realizada no equipamento *ABI 3500® (Applied Biosystems®)*.

Diferentes produtos sobrepostos foram gerados usando pares de *primers* distintos anteriormente desenhados pelo grupo de pesquisa (Figura 8). Em seguida, os produtos amplificados foram purificados com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®)*, seguindo as orientações do fabricante. A pureza dos produtos purificados foi avaliada utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop 1000® (Thermo Scientific®)*, com base nas razões 260/280 e 260/230. A quantificação foi realizada com o *Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific®)*. Posteriormente, os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento.

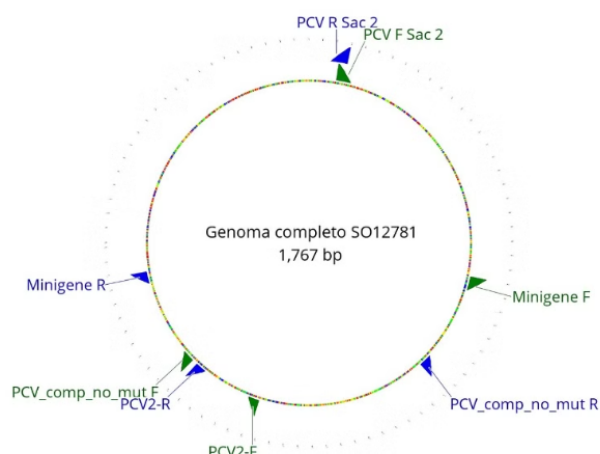


Figura 8. Primers anelados ao genoma do PCV. Conjunto de primers que geram produtos sobrepostos, empregados no sequenciamento do genoma viral completo da amostra utilizada.

Fonte: Acervo pessoal. Ilustração gerada no programa *Geneious Primer*.

As sequências obtidas foram analisadas de acordo com o *Phred score* de cada base sequenciada por meio do emprego do programa *Electropherogram Quality Analysis* disponibilizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Posteriormente, as sequências foram alinhadas com um genoma de referência do PCV2b (código GenBank KF374705.1), utilizando-se o programa *Geneious R8* (KEARSE et al., 2012).

3.2. Plasmídeos e clonagem molecular

O plasmídeo utilizado neste estudo foi adquirido junto ao grupo Genone – Soluções em Biotecnologia. Para o desenho do plasmídeo, foi utilizado o tradicional vetor pUC57 simplificado, incluindo apenas a região de origem de replicação, o gene de resistência à ampicilina com o seu promotor e a sequência de interesse.

O plasmídeo liofilizado foi reconstituído em TE 1 x (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A sequência de interesse para inserção no plasmídeo consistiu no genoma original da amostra selvagem, que foi modificado pela adição de uma extensão que incorpora uma repetição do sítio de restrição NdeI. Com a presença de dois sítios idênticos de restrição, a subsequente excisão do fragmento de DNA foi simplificada, requerendo apenas a digestão com uma única enzima. Na Figura 9 é possível observar uma representação esquemática da estrutura do plasmídeo utilizado (denominado de

Figura 9. Mapa do plasmídeo desenhado para clonagem do genoma do PCV2b. Representação esquemática da estrutura do plasmídeo utilizado para a construção do genoma sintético (denominado de pUC57 + PCV2b), indicando a sequência de interesse destacada em vermelho e os sítios de restrição NdeI duplicados indicados por círculos vermelhos. A seta amarela indica a origem de replicação, a seta verde indica o gene de resistência a ampicilina e a seta branca o promotor deste gene. **Fonte:** Relatório de controle de qualidade de síntese genética. *Genone Biotechnologies*.

As etapas de cultivo em meio sólido e líquido foram testadas e otimizadas de acordo com indicações do protocolo padrão de transformação das células competentes, juntamente com as diretrizes de seleção e preparação de plasmídeos e cepas de *E.coli* fornecidas pelo *kit* de extração de plasmídeos. Para extração dos plasmídeos multiplicados via clonagem molecular em cultura de bactérias, utilizou-se o *kit PureYield® Plasmid Midiprep System (Promega®)* seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dessas extrações foi realizada com o *kit Qubit® dsDNA (Thermo Scientific®)*, de acordo com as instruções do fabricante.

Para confirmar a presença dos plasmídeos nas colônias selecionadas, foi realizado um PCR convencional. A reação de PCR foi realizada utilizando a solução *GoTaq® Green Master Mix (Promega®)*, seguindo as recomendações do fabricante. A reação, com um volume final de 25 µl, foi composta por 12,5 µl do *master mix*, 0,5 µM de cada *primer* e água livre de nucleases para completar o volume final. A amostra utilizada consistiu apenas na transferência com toque de ponteira estéril das colônias selecionadas em meio sólido para crescimento em meio líquido.

Além do plasmídeo clonado para a construção do genoma, também foi realizada a clonagem molecular do plasmídeo *pmaxGFP (Amaxa®)*, que contém a sequência da proteína fluorescente GFP, originária de uma espécie de copepoda. Na figura 10 é mostrado o mapa do vetor *pmaxGFP (Amaxa®)*, com a origem do vetor pUC, o gene de resistência à Canamicina, o promotor CMV (promotor do citomegalovírus), região de íntron e sequência da proteína GFP, seguida da cauda poli A do SV40. Este plasmídeo é fundamental como controle positivo para monitorar a eficiência e a viabilidade da transfecção em células eucarióticas.

Para este procedimento de clonagem molecular, foram utilizadas uma amostra desse plasmídeo e de células DH5α competentes. As células foram tornadas competentes por meio do tratamento com cloreto de cálcio, conforme descrito por Chang e colaboradores (CHANG et al., 2017). A transformação foi conduzida de acordo com o Protocolo Padrão de Transformação para Células de Uso Múltiplo (*Promega®*), com algumas adaptações. Sulfato de canamicina (*Sigma Aldrich®*) reconstituído em água *nuclease free* (30mg/ml) foi utilizado para seleção das colônias transformadas (concentração final de 30µg/ml) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Para confirmação da clonagem, os produtos foram avaliados pelas análises de PCR e perfil de fragmento por eletroforese em gel de agarose. Concomitantemente, alíquotas

de bactérias transformadas foram preparadas para congelamento a -80°C , com a adição de 10% de glicerol como crioprotetor. O congelamento das células ocorreu quando a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) estava entre 0,4 e 0,6, indicando o início da fase de crescimento bacteriano exponencial (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).



Figura 10. Mapa do vetor *pmaxGFP* (Amaya®). Representação esquemática da estrutura do vetor com a origem do vetor pUC, o gene de resistência à canamicina, o promotor do citomegalovírus, região de íntron e sequência da proteína fluorescente GFP, seguida da cauda poli A do SV40. As localizações aproximadas de alguns sítios de restrição estão destacadas em azul.

Fonte: Amaya news.

3.3. Construção do genoma viral sintético

A construção do genoma circular do PCV2b foi realizada utilizando-se a endonuclease de restrição NdeI em conjunto com a enzima T₄ DNA Ligase, ambas fornecidas pela *New England BioLabs*®. O procedimento seguiu as instruções do fabricante e incluiu testes variando temperaturas e tempos de reação.

Para a digestão foram utilizadas 10 unidades da enzima NdeI, *rCutSmart Buffer* com uma concentração final de 1x, 1000 ng de DNA e água livre de nucleases para completar o volume final de 50 µl. Foram testadas as seguintes incubações: 37 °C por 15 minutos, 37 °C por 1 hora e 4 °C *overnight*, com a tampa aquecida a 50 °C para prevenir a formação de aerossóis. Todas as incubações foram seguidas de inativação à 65 °C por 20 minutos.

Posteriormente à digestão, o produto resultante foi separado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% a 100 V por aproximadamente 90 minutos. As bandas referentes ao genoma excisado do plasmídeo foram então identificadas com base no seu peso molecular,

recortadas do gel e purificadas por meio do *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), conforme recomendações do fabricante. Após a purificação, o produto eluído foi quantificado pelo *Qubit® dsDNA* (Thermo Scientific®), de acordo com as instruções do fabricante, e sua pureza foi analisada pelo espectrofotômetro *NanoDrop 1000®* (Thermo Scientific®).

Para a reação de ligação com a T₄ DNA Ligase foram utilizadas três unidades da enzima, tampão com concentração final de 1x, 500 ng de DNA e água livre de nucleases para completar o volume final de 20 µl. As incubações foram realizadas a 25 °C por três horas e 4 °C *overnight*, sendo em seguida a T₄ DNA Ligase inativada a 65 °C por 10 minutos.

3.4. Validação da construção do genoma viral sintético

Para validar a construção do produto, uma abordagem abrangente foi seguida. Inicialmente, uma PCR convencional foi realizada utilizando-se *primers* que flanqueiam o sítio de restrição NdeI. Posteriormente, a identidade do produto obtido foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, o produto foi purificado com base em um protocolo *in house* que utiliza *beads* magnéticas, garantindo uma preparação de alta qualidade.

O sequenciamento Sanger desempenhou um papel crucial na verificação da integridade da sequência das bases no sítio de restrição, fornecendo uma confirmação precisa da ligação e da integridade das bases nesta região. Além disso, foram conduzidas reações de qPCR, com uma delas envolvendo a mesma região que flanqueia o sítio de restrição NdeI, enquanto que a outra baseou-se na extremidade oposta do DNA de fita dupla circular que compõe o genoma do PCV2b (Figura 11).

As análises de qPCR permitiram verificar o número de cópias do produto realmente circularizado durante a reação de ligação, confirmando a eficácia do processo de montagem do genoma viral sintético. A geração desses diferentes produtos de lados opostos do genoma circular proporciona meio de comparação de Cq. Uma vez que o lado oposto ao sítio de restrição manteve-se íntegro durante todos os processos anteriores, o Cq dos produtos obtidos desse lado serve de referencial para avaliação do número de cópias do produto realmente circularizado a partir do sítio de restrição NdeI.

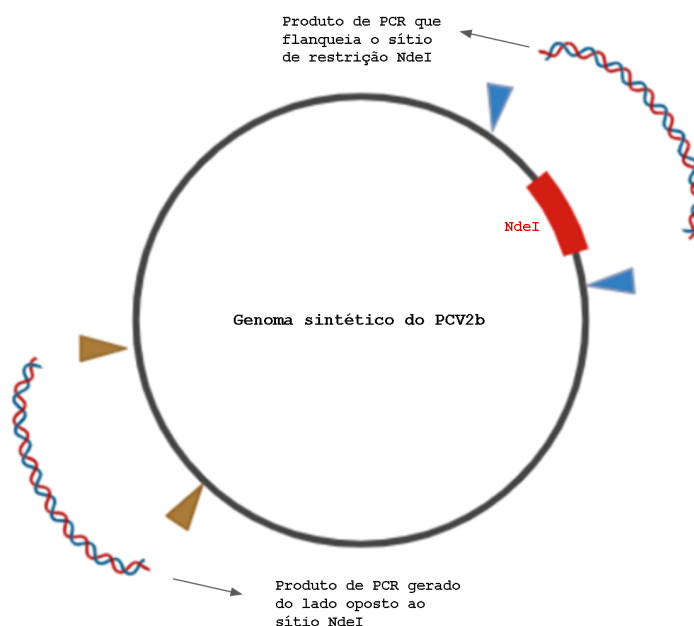


Figura 11. Produtos de qPCR gerados a partir do genoma sintético para quantificação do produto circularizado na reação de ligação. Representação esquemática dos produtos de qPCR gerados para verificação do número de cópias realmente circularizado na reação de ligação para montagem do genoma viral circular sintético do PCV2b. As setas em azul indicam pares de *primers* que geram produtos de PCR que flanqueiam o sítio de restrição da NdeI (retângulo vermelho), enquanto as setas marrons indicam pares de *primers* usados para geração de produtos do lado oposto ao sítio.

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

3.5. Cultivo de células de linhagem de testículo suíno (ST)

As células ST (células epiteliais testiculares de suínos) foram cultivadas em meio MEM (meio Eagle modificado de Dulbecco – Gibco BRL[®]) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB - *Gibco BRL*[®]) e, posteriormente, mantidas em estufa a 37 °C. A inspeção das garrafas de cultivo foi realizada diariamente para verificar a confluência celular. As garrafas de cultivo com confluência de aproximadamente 80% a 90% foram então submetidas a repiques em ambiente de fluxo laminar a fim de promover a propagação e renovação das células.

Concomitantemente, novas alíquotas obtidas das garrafas de cultivo foram preparadas para congelamento, que consistia em 70% do meio de cultura MEM, 20% de soro fetal bovino (SFB) e 10% do agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO). Estas alíquotas foram inicialmente armazenadas a -80 °C por 24 horas e, posteriormente, transferidas para

dewars contendo nitrogênio líquido a -196°C de modo a manter sempre um estoque de células viáveis.

Diferentes quantidades de células foram avaliadas em placas com 6 e 24 poços, de acordo com o seguinte esquema: $0,25 \times 10^6$; $0,5 \times 10^6$ ou 1×10^6 células nas placas de seis poços e $0,5 \times 10^5$; 1×10^5 ou 2×10^5 células nas placas de 24 poços. As células ST foram contadas utilizando o corante vital *Trian Blue* na câmara de Neubauer, sendo então plaqueadas em duplicata com meio MEM enriquecido, respectivamente, com 2% ou 10% de soro fetal bovino e, em seguida, mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 e 80% de umidade, com monitoramento realizado no período entre 6 e 24 horas após o plaqueamento.

3.6. Produção de partículas virais sintéticas

A produção de partículas virais sintéticas foi induzida a partir da transfecção do genoma viral sintético em cultura de células ST. O método de transfecção utilizado foi o de lipofecção com lipídeos catiônicos, utilizando o reagente *Lipofectamine[®] 3000 (Invitrogen[®])*, conforme instruções do fabricante. Assim como outras técnicas de transfecção, a lipofecção não é universalmente bem-sucedida, apresentando variações significativas de acordo com a linhagem celular. Diferentes tipos de células podem, portanto, responder de maneira diversa ao mesmo protocolo de lipofecção (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Portanto, diferentes quantidades de reagente foram testadas em meios com confluência celular entre 30% e 40%, sendo, inicialmente, utilizados dois volumes diferentes do reagente de transfecção (0,75 μL e 1,5 μL) e duas quantidades diferentes de DNA (200 ng ou 500 ng) por poço.

Em um primeiro conjunto de experimentos, os ensaios de transfecção foram executados utilizando-se apenas o vetor *pmaxGFP (Amaxa[®])*, de modo a verificar o sucesso do procedimento. Subsequentemente, os ensaios de transfecção envolveram o genoma sintético do PCV2b e diferentes controles, como uma amostra de DNA selvagem do PCV2b extraída de soro de suíno com alta carga viral ($> 10^9$ cópias/mL) e um controle negativo contendo apenas os reagentes, além do vetor *pmaxGFP*. Os ensaios de transfecção foram também executados com duas formas diferentes do genoma sintético do PCV2: dsDNA e ssDNA (esta última obtida após desnaturação térmica a 96°C por dez minutos, seguida de choque térmico em gelo por dois minutos).

Nos primeiros testes envolvendo o genoma sintético do PCV2b, as células foram mantidas em placas até o fim de sua viabilidade e as amostras de sobrenadante foram coletadas a cada 24 horas a partir do início da transfecção ($t = 0$) e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

Testes posteriores também foram realizados de modo a manter as células em placas por cinco dias, sendo, a partir de então, transferidas para garrafas de 25 cm^2 . Neste caso, após 24 horas da transfecção, as células foram repicadas na proporção de 1:1 em placas. Quatro dias após esse repique, as células foram então transferidas para garrafas e repicadas conforme necessário para acomodar o crescimento celular. Nestes novos testes, as amostras de sobrenadante e células foram coletadas em intervalos de 24 horas a partir do momento inicial da transfecção ($t = 0$) e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores. Adicionalmente, alíquotas viáveis da cultura transfectada foram também preparadas e congeladas em meio contendo crioprotetor a cada duas passagens celulares.

3.7. Validação da produção de partículas virais sintéticas

A avaliação da produção experimental de partículas virais infectantes foi inicialmente executada por meio de ensaios de qPCR e ELISA utilizando-se amostras coletadas durante os ensaios de transfecção e infecção. As reações de qPCR foram empregadas para avaliar a produção de DNA viral com o objetivo de realizar uma quantificação relativa do DNA com o emprego de uma curva padrão da carga viral como referência. Adicionalmente, o ELISA foi utilizado para avaliar a síntese da proteína Cap.

As células transfectadas com o vetor *pmaxGFP* (Amaya[®]) foram analisadas por microscopia de fluorescência para verificar a expressão do gene verde fluorescente (GFP) e, conseqüentemente, o sucesso do processo de transfecção. Para a extração de DNA total das células transfectadas foi utilizado o *kit MagMAX[®] CORE Nucleic Acid Purification* (Sigma Aldrich[®]), conforme as instruções do fabricante, com o auxílio do equipamento *KingFisher[®] Flex Purification System* (Thermo Scientific[®]).

As reações quantitativas de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas com os *primers forward* (5'-GAT GAT CTA CTG AGA CTG TGT GA-3') e *reverse* (5'-AGA GCT TCT ACA GCT GGG ACA-3') projetados para amplificar um produto de 152 pares de bases

(pb) da ORF1 do PCV (LAEDEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002). O kit *GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega[®])* foi empregado seguindo as instruções do fabricante, com um volume final de 20 µl, sendo 10 µl de master mix, *primers* (com concentração final de 200 nM), 4 µl de amostra e água livre de nucleases q.s.p. As condições das reações seguiram os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e uma curva de dissociação padrão de 95 °C a 60 °C (CRUZ et al., 2006). Os controles negativos das reações foram compostos apenas de água livre de nucleases.

A metodologia dos testes de ELISA conduzidos para a detecção da proteína Cap foi adaptada de Cruz e colaboradores (CRUZ et al., 2016). O preparo das amostras neste caso envolveu o tratamento do sobrenadante de cultivo celular com 5% de *Vertrel[®] (DuPont[®])*, seguido de centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos a 4 °C.

Ensaio de infecção também foram conduzidos para avaliação da montagem de partículas virais infectantes. Assim, cerca de 5 ml de sobrenadante de células transfectadas cultivadas foi utilizado para infectar células saudáveis com aproximadamente 60% de confluência. Após 10 minutos de homogeneização, o meio de infecção foi descartado e 10 ml de meio com 10% de soro fetal bovino (SFB) foram acrescentados à garrafa de cultivo. Neste caso, alíquotas de sobrenadantes foram coletadas em intervalos de 24 horas e armazenadas a -20°C para análises posteriores.

A estrutura externa do capsídeo das partículas virais sintéticas do PCV2b foi avaliada em ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET) com o uso de coloração negativa. Tal método foi escolhido pois esta abordagem permite a visualização de características importantes para identificar e diferenciar partículas virais, como a morfologia e o diâmetro da estrutura externa. O processo de preparação é relativamente simples, e usa sais elétron-densos como corantes eletrônicos (BRENNER; HORNE, 1959; UEDA et al., 1995).

A preparação das amostras para a realização destes ensaios de microscopia eletrônica consistiu na clarificação do sobrenadante de cultivo celular com 5% de *Vertrel[®] (DuPont[®])* centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. Seguido de ultracentrifugação deste sobrenadante resultante a 190.000xg por 3 horas a 4°C para concentração viral. O *pellet* resultante desta etapa foi ressuspenso em PBS 1x (10mM PO_4^{3-} , 2,7mM KCl, 137mM NaCl, pH7,4), carregado em almofadas de sacarose de 20% e 50%, e novamente ultracentrifugado a 190.000xg por 3 horas a 4°C. Os sobrenadantes e frações de todas as etapas foram testadas por qPCR. As frações finais com maior carga viral foram selecionadas para a microscopia

eletrônica e diluídas em PBS 1x numa proporção de 1:4. As amostras foram coradas com o emprego de uranila e a visualização em *grids* de 200 *mesh*.

As grades foram limpas e tornadas hidrofílicas no equipamento *easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System (PELCO®)*. Três μL de amostra foram aplicados na face de carbono da grade e deixados em contato por 1 minuto. Posteriormente, o excesso de amostra foi removido com papel filtro. Imediatamente após essa etapa, foram aplicados 3 μL de acetato de uranila 2% sobre a face de carbono e deixados por 30 s, posteriormente o excesso de acetato de uranila foi removido com papel filtro. Essa etapa com uranila foi repetida uma segunda vez e, depois de remover o excesso de acetato de uranila com papel filtro, a grade secou completamente em temperatura ambiente antes de ser armazenada para posterior análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Genotipagem e sequenciamento do genoma viral selvagem

Conforme os testes de genotipagem com uso de sondas foram realizados, uma amostra da espécie PCV2b foi escolhida para sequenciamento e subsequente utilização no projeto. Os resultados do sequenciamento confirmaram a presença de um genoma com 1767 pares de bases, em conformidade com a sequência de referência (código GenBank KF374705.1) (Figura 12).

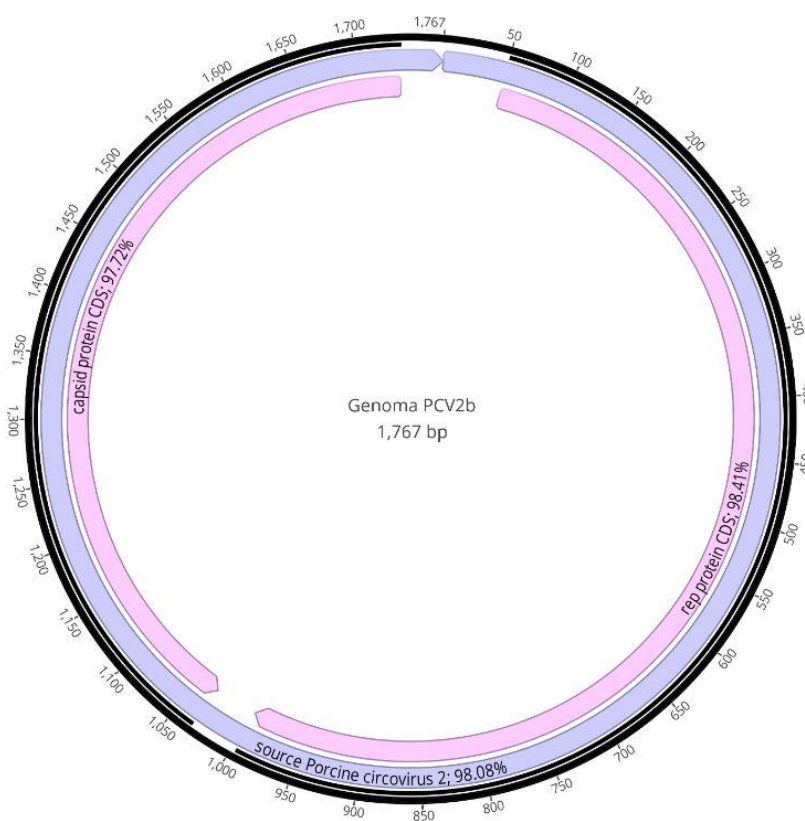


Figura 12. Sequenciamento do genoma viral selvagem alinhado com regiões da sequência de referência (KF374705.1). A região destacada em lilás indica uma identidade de 98,08% no alinhamento global entre o genoma sequenciado e o genoma de referência. As regiões destacadas em rosa mostram uma identidade de 98,41% na sequência que codifica o complexo proteico Rep (ORF1) e 97,72% na região que codifica a proteína Cap (ORF2).

Fonte: Ilustração gerada no programa *Geneious Prime*.

O alinhamento global da sequência determinada com a sequência de referência mostrou uma identidade de 98,08% (Figura 12), além de confirmar os valores de localização mínima e máxima, tamanho e orientação de cada ORF (Tabela 2). Dentro de cada gênero, o limiar de demarcação de espécies é de 80% da identidade da sequência de nucleotídeos em todo o genoma (BREITBART et al., 2017).

Tabela 2. Valores de localização mínima e máxima, tamanho e direção de cada ORF no genoma do PCV2b conforme a sequência de referência (código *GenBank* KF374705.1).

Região	Base inicial	Base final	Tamanho (pb)	Direção
Proteína Cap (ORF2)	1033	1734	702	negativa
Proteína Rep (ORF1)	51	995	945	positiva

4.2. Plasmídeos e clonagem molecular

Os plasmídeos obtidos das colônias selecionadas foram verificados individualmente por meio de uma PCR convencional e posterior análise do peso molecular dos produtos em gel de agarose. Na Figura 13 podem ser observadas as bandas obtidas após os ensaios de PCR realizadas com diferentes colônias, identificadas como 1a, 2a, 1b, 2b, 3b e 4b, além do controle negativo da reação e do marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases). Todas as colônias, com exceção da colônia 2a, apresentaram um resultado positivo para o inserto, exibindo uma banda na faixa de aproximadamente 1500 pb.

Os plasmídeos foram separados por eletroforese em gel de agarose para confirmar sua identidade com base em seu peso molecular. Na figura 14 temos a separação dos plasmídeos extraídos de diferentes colônias, identificadas como 1a, 1b, 2b, 3b e 4b. Bandas intensas estão alinhadas entre as marcações de 3000 pb e 4000 pb, confirmando o tamanho correspondente ao plasmídeo clonado. As outras bandas próximas referem-se a outras conformações plasmidiais, o que foi confirmado a partir de uma qPCR de quantificação relativa descrita no item 3.7.

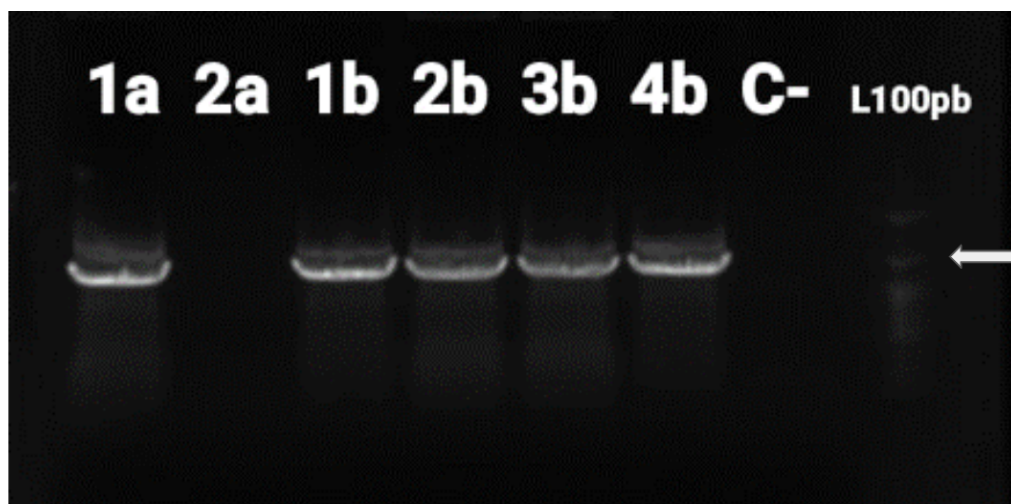


Figura 13. Gel de eletroforese com produtos de PCR das colônias. PCRs realizadas com diferentes colônias, identificadas como 1a, 2a, 1b, 2b, 3b e 4b, além do controle negativo da reação e do marcador de peso molecular de 100pb. Todas as colônias, com exceção da colônia 2a, apresentaram um resultado positivo para o inserto, exibindo uma banda na faixa de aproximadamente 1500 pb, como indicado pela seta branca.

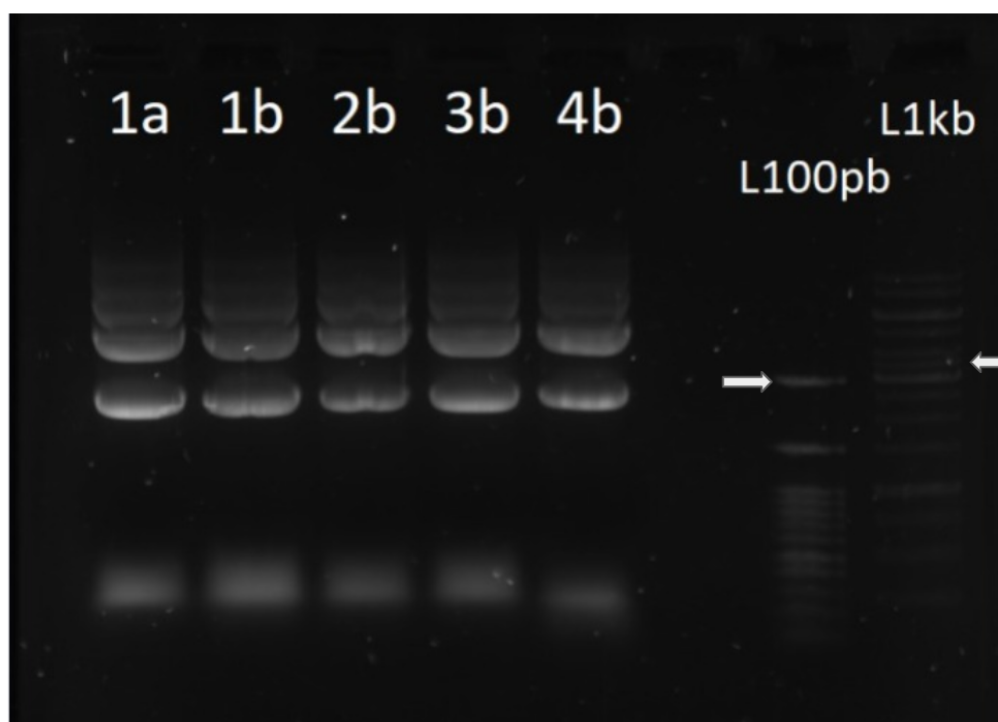


Figura 14. Gel de eletroforese com plasmídeos contendo o gene sintético. Separação dos plasmídeos extraídos de diferentes colônias, identificadas como 1a, 1b, 2b, 3b e 4b. As bandas intensas alinhadas entre as marcações de 3000 pb (seta voltada a direita) e 4000 pb (seta voltada a esquerda) correspondem ao plasmídeo clonado. As outras bandas próximas referem-se a outras conformações plasmidiais.

4.3. Construção do genoma viral sintético

Os melhores ensaios de incubação da reação de digestão enzimática realizada com a endonuclease de restrição NdeI foram aqueles realizados a 37 °C por 15 minutos, com inativação enzimática a 65 °C por 20 minutos, como constatado nas quantificações após a purificação do produto de digestão separado em eletroforese em gel de agarose.

Os melhores ensaios de incubação da reação de ligação com a T₄ DNA Ligase foram realizados a 4 °C *overnight*, com posterior inativação enzimática a 65 °C por 10 minutos, como visto nas reações de qPCR da ligação de extremidades opostas.

4.4. Validação da construção do genoma viral sintético

O sequenciamento do produto de PCR com *primers* flanqueando o sítio de restrição demonstrou que o mesmo se manteve íntegro após as etapas de digestão e ligação enzimática para a construção do genoma viral sintético. Na figura 15 é possível observar essa sequência íntegra.

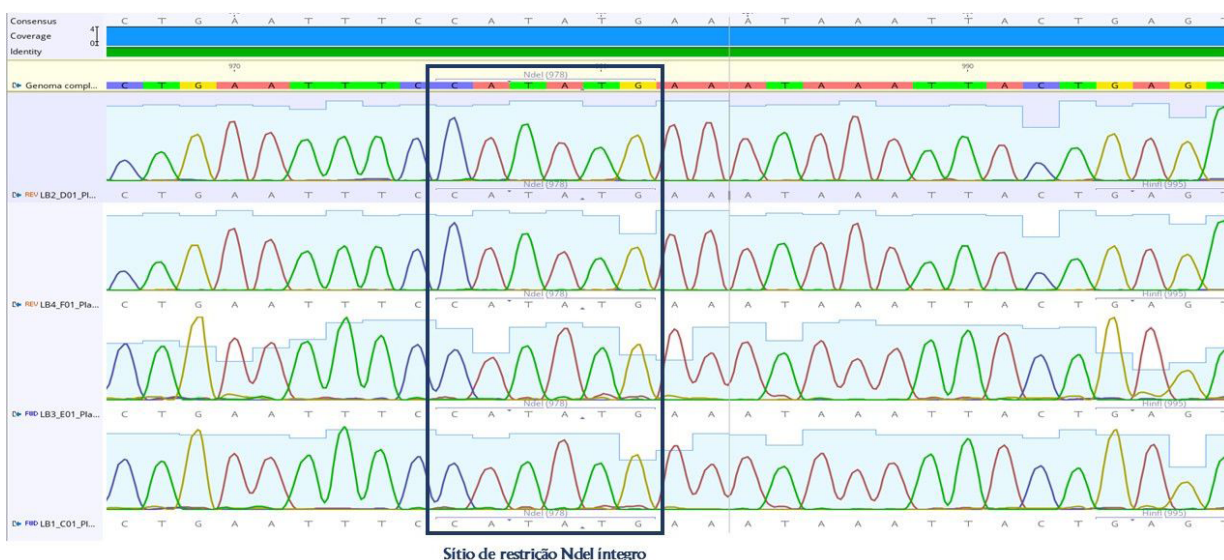


Figura 15. Sequenciamento do sítio de restrição NdeI após a montagem do genoma sintético. Resultado de sequenciamento evidenciando a integridade da sequência de nucleotídeos no sítio de restrição da endonuclease Nde I, utilizado para a excisão e circularização do genoma sintético do PCV2b.

Fonte: Ilustração gerada no programa *Geneious Prime*.

O resultado da reação de qPCR dos produtos das reações de ligação pode ser observado na figura 16. As curvas de desnaturação de cada produto apresentam picos

alinhados com seus controles positivos, indicando a especificidade da reação. A comparação de Cqs (ciclos de quantificação) entre as extremidades opostas apresenta um resultado menor do que um Cq de diferença, indicando, da mesma forma, a uniformidade das moléculas presentes, que se apresentam devidamente circularizadas após a reação de ligação.

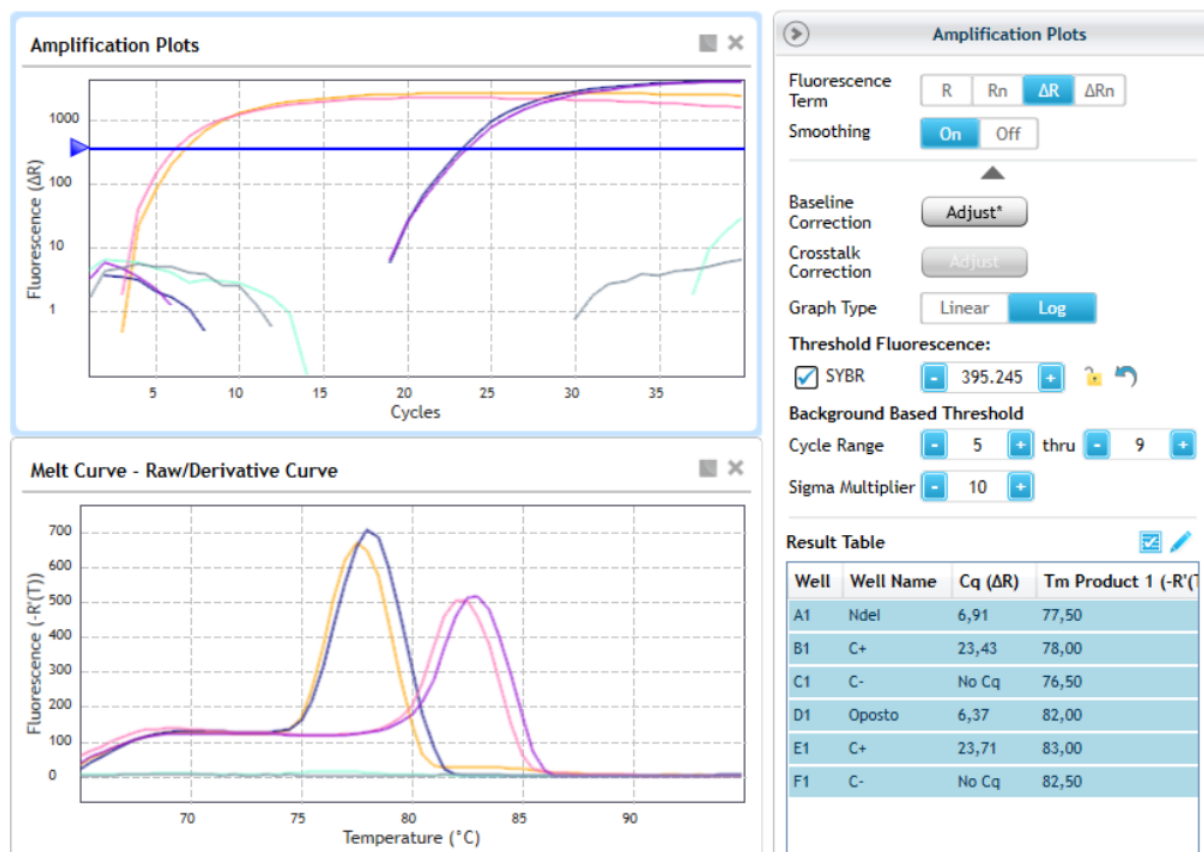


Figura 16. Resultado da qPCR da ligação. As curvas de amplificação amarela e laranja referem-se às reações com *primers* flanqueando o sítio de restrição NdeI e sua extremidade oposta do genoma, respectivamente. As curvas azul e rosa referem-se aos controles positivos de cada reação. As curvas de melt de cada produto apresentam picos alinhados com seus controles positivos. A tabela azul fornece os dados de localização na placa (*well*), nome de cada reação (*well name*), ciclo de quantificação (Cq) e temperatura de desnaturação (Tm). As temperaturas de desnaturação de cada reação apresentam uma variação menor do que 1° C em relação ao controle positivo, indicando a especificidade da reação. A comparação de Cqs entre as extremidades opostas (NdeI e Oposto) apresenta um resultado menor do que um Cq de diferença, indicando a uniformidade das moléculas, que se apresentam devidamente circularizadas após a reação de ligação.

Fonte: Ilustração gerada pelo aplicativo *Agilent Aria 2.1*.

4.5. Cultivo de células de linhagem de testículo suíno (ST)

A cultura celular é uma prática com diversas aplicações, sendo indispensável para os ensaios de transfecção e produção de partículas virais infectantes do PCV2b. Para

encontrar a concentração ideal de células em cada placa e garantir o êxito dos ensaios de transfecção, uma série de testes de plaqueamento com diferentes placas e densidades celulares foi realizada. Observou-se que a placa com 24 poços, quando plaqueada com 1×10^5 células, apresentou os resultados mais consistentes e ideais para utilização nos ensaios de transfecção.

Nos experimentos realizados em placas com 6 poços, observou-se que, após 24 horas, poços que continham $0,25 \times 10^6$ células atingiram uma confluência de 90%, enquanto aqueles com $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 células alcançaram 100% de confluência. No entanto, com 48 horas de incubação, todos os poços nessas placas apresentaram um número significativo de células mortas e um efeito de borda acentuado. Ao atingir 72 horas, a maioria das células do tapete celular encontrava-se solta, demonstrando que o uso de placas com 6 poços não oferece vantagens para os ensaios de transfecção.

Já nos testes realizados com densidades celulares de $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 ou 2×10^5 células em placas com 24 poços, os resultados mostraram que, após 24 horas de incubação, os poços com $0,5 \times 10^5$ células alcançaram uma confluência de aproximadamente 30%, enquanto que os poços com 1×10^5 células atingiram cerca de 40% de confluência. Já poços com 2×10^5 células apresentaram uma confluência de aproximadamente 70% no mesmo período. Apenas após 48 horas os poços com $0,5 \times 10^5$ células mostraram um aumento na confluência, atingindo cerca de 60%, enquanto que os poços com 2×10^5 células apresentaram um grande número de células mortas. Já os poços com 1×10^5 células alcançaram uma confluência de aproximadamente 90% nesse mesmo período. Assim, foi possível determinar que placas com 24 poços, quando preparadas com uma densidade celular de 1×10^5 , apresentaram os resultados mais consistentes e ideais para utilização nos ensaios de transfecção, que demandam uma confluência ideal de 40% a 60%.

Esses resultados ressaltam a importância da seleção da densidade celular apropriada para garantir o sucesso dos experimentos de transfecção, especialmente considerando a dependência das proteínas da fase S do ciclo celular para a replicação do circovírus suíno, como evidenciado por Tischer et al. (1987). Portanto, a partir desses trabalhos de cultivo celular, foi possível a realização de experimentos bem-sucedidos de transfecção, como mostrado a seguir, utilizando-se densidades prévias de 1×10^5 células e transfecção após 24 horas do plaqueamento, quando a confluência celular alcançou entre 30% e 40% de cobertura.

4.6. Produção de partículas virais sintéticas

Nos primeiros ensaios de transfecção foram utilizados apenas o controle positivo com o vetor *pmaxGFP* em duas quantidades diferentes e dois volumes do reagente *Lipofectamine*[®] 3000 (*Invitrogen*[®]), de modo a demonstrar-se a possibilidade de transfecção nas células ST. Neste caso, foi observado que as células responderam de forma mais eficaz a uma menor quantidade do reagente e apresentaram resultados satisfatórios mesmo com uma quantidade de DNA inferior àquela indicada pelo protocolo de transfecção, resultando em melhores níveis de expressão da proteína GFP e maior sobrevivência das células ao longo do tempo.

Esses procedimentos iniciais foram cruciais para avaliar-se a permissividade das células ST em relação ao método de transfecção empregado e também para a determinação da quantidade mínima de reagente que garantisse a eficácia da transfecção e, ao mesmo tempo, a ausência de efeitos adversos significativos nas células ST cultivadas. Além disso, estes ensaios foram, da mesma forma, muito importantes para a padronização do uso de quantidades pequenas de DNA, visto que a baixa eficiência dos procedimentos de construção do genoma viral sintético não permitia a utilização de quantidades relativamente grandes deste material.

Os resultados destes procedimentos iniciais mostraram a detecção de fluorescência nos poços transfectados com o vetor *pmaxGFP*, conforme mostrado na Figura 17, onde também são mostrados os resultados dos testes com diferentes volumes do reagente e quantidades do vetor. Com base nesses resultados, os ensaios de transfecção posteriores com o genoma viral sintético do PCV2b foram conduzidos utilizando-se 0,75 µl do reagente de transfecção *Lipofectamine*[®]3000 e 200 ng do material genético. Além disso, foram incluídos os seguintes controles: 200 ng de DNA viral, 200 ng do vetor *pmaxGFP* e um controle negativo contendo apenas o reagente de transfecção.

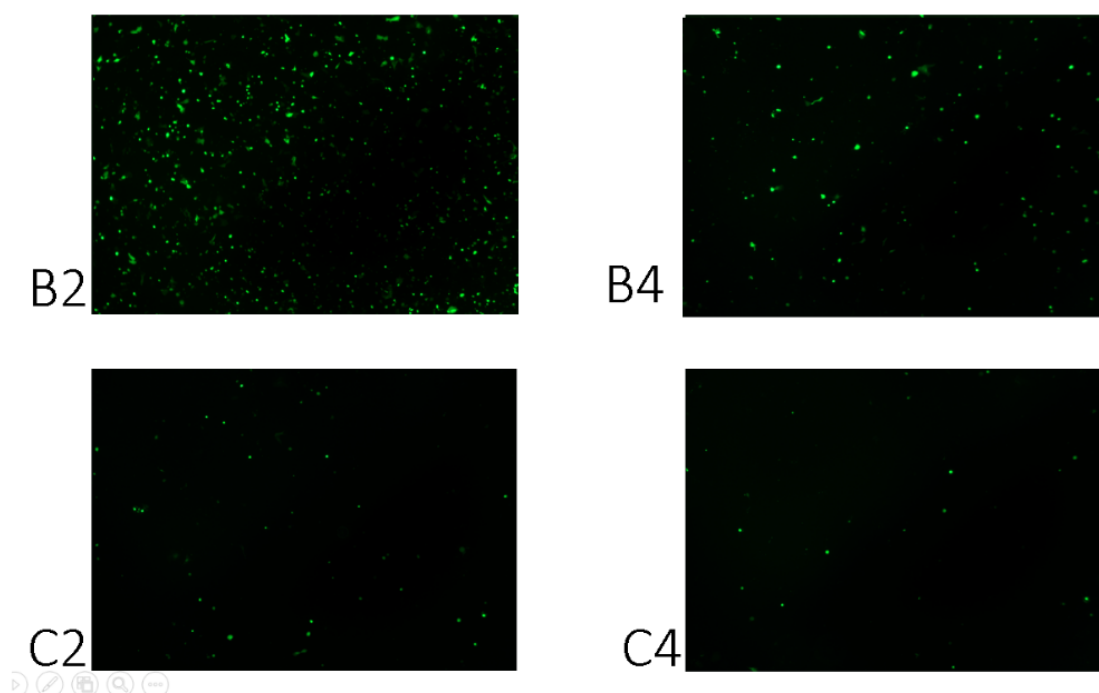


Figura 17. Análise de microscopia de fluorescência dos ensaios iniciais de transfecção das células ST com o reagente de transfecção *Lipofectamine*[®] 3000 e o vetor *pmaxGFP* em diferentes quantidades. (B2) 0,75 µl do reagente de transfecção e 500 ng do vetor; (C2) 1,50 µl do reagente de transfecção e 500 ng do vetor; (B4) 0,75 µl do reagente de transfecção e 200 ng do vetor; (C4) 1,50 µl do reagente de transfecção e 200 ng do vetor. Pode-se observar que as células responderam de forma mais eficaz a uma menor quantidade do reagente (B2 e B4) e apresentaram resultados satisfatórios mesmo com uma quantidade de DNA inferior àquela indicada pelo protocolo de transfecção (B4 e C4).

4.7. Validação da produção de partículas virais sintéticas

Inicialmente, apesar da fluorescência continuar sendo detectada no experimento controle com transfecção do vetor *pmaxGFP*, e nenhuma carga viral significativa ser detectada no experimento de controle negativo, o controle celular envolvendo o material genético do PCV2b extraído de uma amostra de campo não demonstrou uma variação significativa do DNA viral quantificado. Já a análise das alíquotas provenientes dos ensaios de transfecção com o genoma sintético sem renovação celular revelou apenas um pequeno aumento da carga viral, seguido de um declínio evidente após 120 horas (Tabela 3) (Figura 18A).

Tabela 3. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR nos ensaios de transfecção realizados com DNA fita dupla (dsDNA) do PCV2b sem renovação celular em placa.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
dsDNA (0 h)	15,5	$8,6 \times 10^6$
dsDNA (24 h)	15,2	$1,0 \times 10^7$
dsDNA (48 h)	15,0	$1,2 \times 10^7$
dsDNA (72 h)	14,8	$1,2 \times 10^7$
dsDNA (96 h)	14,9	$1,2 \times 10^7$
dsDNA (120 h)	25,7	$3,2 \times 10^4$

Nos testes subsequentes realizados com o material genético sintético do PCV2b nas formas de fita dupla (dsDNA) e simples (ssDNA), durante os quais as células foram submetidas a passagens para propagação e renovação celular em placa e posterior passagem das células para cultivo em garrafas, foi observada uma redução na carga viral após o repique em placa e um novo aumento dessa carga após intervalos de incubação (Figuras 18B e 18C) (Tabelas 4-7).

Tabela 4. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR nos ensaios de transfecção realizados com DNA fita dupla (dsDNA) do PCV2b com renovação celular em placa.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
dsDNA (0 h)	9,0	$1,5 \times 10^9$
dsDNA (24 h)	8,3	$2,3 \times 10^9$
dsDNA (48 h)*	16,4	$9,5 \times 10^6$
dsDNA (72 h)	15,0	$2,4 \times 10^7$
dsDNA (96 h)	12,2	$1,7 \times 10^8$
dsDNA (120 h)*	16,5	$8,8 \times 10^6$

* Amostra coletada 24 horas após repique celular.

Tabela 5. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR nos ensaios de transfecção realizados com DNA fita simples (ssDNA) do PCV2b com renovação celular em placa.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
ssDNA (0 h)	11,6	$2,5 \times 10^8$
ssDNA (24 h)	11,4	$2,8 \times 10^8$
ssDNA (48 h)*	21,7	$2,6 \times 10^5$
ssDNA (72 h)	14,4	$3,8 \times 10^7$
ssDNA (96 h)	14,0	$4,9 \times 10^7$
ssDNA (120 h)*	15,3	$2,0 \times 10^7$

* Amostra coletada 24 horas após repique celular.

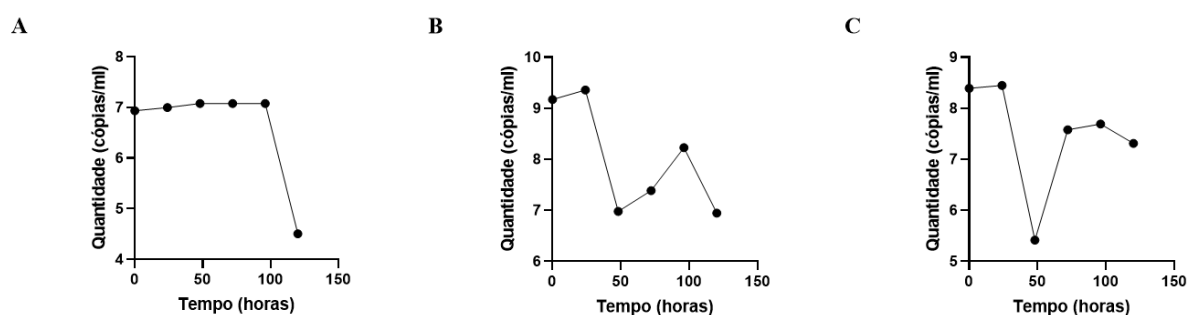


Figura 18. Quantificação determinada por qPCR do material genético do PCV2b em intervalos de 24 horas após transfecção em placa. (A) ensaio de transfecção realizado sem renovação celular; (B) ensaio de transfecção realizado com DNA fita dupla (dsDNA) do PCV2b com renovação celular; (C) ensaio de transfecção realizado com DNA fita simples (ssDNA) do PCV2b com renovação celular. Nas figuras B e C é possível ver uma redução na carga viral após o repique e um novo aumento dessa carga após intervalos de incubação. Os valores de quantificação foram plotados em log base 10 para melhor visualização.

Fonte: Ilustração gerada pelo programa *GraphPad Prism 8*.

Após a passagem das células transfectadas do cultivo em placa para o cultivo em garrafas, o mesmo comportamento de aumento da carga viral foi observado após intervalos de incubação em que as células eram propagadas (Tabelas 6-7) (Figuras 19 A e B).

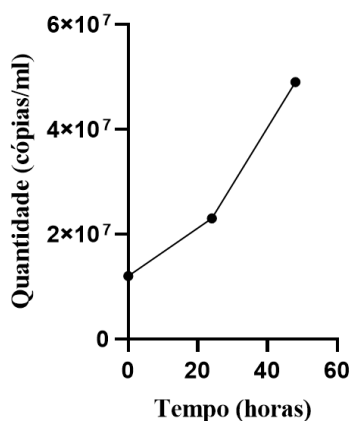
Tabela 6. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR nos ensaios de transfecção realizados com DNA fita dupla (dsDNA) do PCV2b após passagem para a garrafa e anterior ao congelamento de alíquotas viáveis.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
dsDNA (0 h)	16,0	$1,2 \times 10^7$
dsDNA (24 h)	15,1	$2,3 \times 10^7$
dsDNA (48 h)	14,0	$4,9 \times 10^7$

Tabela 7. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR nos ensaios de transfecção realizados com DNA fita simples (ssDNA) do PCV2b após passagem para a garrafa e anterior ao congelamento de alíquotas viáveis.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
ssDNA (0 h)	16,7	$8,1 \times 10^6$
ssDNA (24 h)	14,8	$2,9 \times 10^7$
ssDNA (48 h)	13,4	$7,6 \times 10^7$

A



B

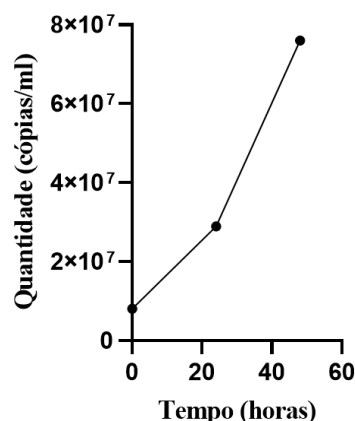


Figura 19. Gráficos com a quantificação determinada por qPCR do material genético do PCV2b em intervalos de 24 horas após transferência do cultivo em placa para cultivo em garrafas. (A) cultivo em garrafa após ensaio de transfecção realizado com DNA fita dupla (dsDNA) do PCV2b; (B) cultivo em garrafa após ensaio de transfecção realizado com DNA fita simples (ssDNA) do PCV2b. Nas figuras é possível observar aumento na carga viral após intervalos de incubação.

Fonte: Ilustração gerada pelo programa *GraphPad Prism 8*.

As alíquotas viáveis reservadas para congelamento também mostraram o mesmo padrão, ou seja, redução na carga viral após o repique seguida de um novo aumento dessa carga após intervalos de incubação (Tabelas 8 e 9). Esta diferença de quantificação da carga viral pode ser atribuída ao maior número de células ST na fase S (de multiplicação celular) devido à execução dos repiques, que foram, portanto, fundamentais para o processo replicativo viral.

Tabela 8. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR das alíquotas viáveis após descongelamento.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
dsDNA (0 h)	11,7	$8,0 \times 10^7$
dsDNA (1 dia)	12,9	$4,0 \times 10^7$
dsDNA (2 dias)*	22,2	$9,2 \times 10^4$
dsDNA (7 dias)	15,9	$1,1 \times 10^7$
dsDNA (8 dias)*	19,1	$1,6 \times 10^6$
dsDNA (9 dias)	19,9	$9,8 \times 10^5$
dsDNA (10 dias)	16,6	$5,7 \times 10^6$
dsDNA (11 dias)*	17,2	$3,9 \times 10^6$
dsDNA (12 dias)	15,3	$1,2 \times 10^7$
dsDNA (13 dias)	14,8	$1,7 \times 10^7$
dsDNA (14 dias)*	36,7	$3,7 \times 10^1$
dsDNA (15 dias)*	17,4	$3,6 \times 10^6$

* Amostra coletada 24 horas após repique celular.

Tabela 9. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação determinados por qPCR das alíquotas viáveis após descongelamento.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
ssDNA (0 h)	9,2	$3,8 \times 10^8$
ssDNA (1 dia)	11,4	$4,4 \times 10^7$
ssDNA (2 dias)*	9,5	$1,3 \times 10^8$
ssDNA (7 dias)	13,0	$6,3 \times 10^7$
ssDNA (8 dias)*	16,1	$9,6 \times 10^6$
ssDNA (9 dias)	16,6	$7,2 \times 10^6$
ssDNA (10 dias)	16,0	$8,6 \times 10^6$
ssDNA (11 dias)*	16,5	$6,0 \times 10^6$
ssDNA (12 dias)	15,4	$1,2 \times 10^7$
ssDNA (13 dias)	14,9	$1,5 \times 10^7$
ssDNA (14 dias)*	20,3	$6,2 \times 10^5$
ssDNA (15 dias)*	18,5	$1,9 \times 10^6$

*** Amostra coletada 24 horas após repique celular.**

Assim, com base nos resultados de qPCR foram executados ensaios de infecção para comprovar a produção de partículas virais sintéticas infectantes nos experimentos de transfecção. Estes ensaios de infecção permitiram a manutenção de uma carga viral significativa durante um período de 15 dias, indicando, portanto, a manutenção da replicação viral, o que evidencia a presença de partículas virais infectantes nas amostras obtidas a partir dos experimentos de transfecção (Tabela 10). No caso deste ensaio, é importante destacar que a variação nas quantificações realizadas por qPCR ocorreu devido aos repiques realizados para acomodar o crescimento celular.

Tabela 10. Valores de Cq (ciclo de quantificação) e quantificação do DNA do PCV2b determinados no ensaio de infecção com renovação celular executado com amostras dos experimentos de transfecção.

Amostra (tempo)	Cq	Quantidade (cópias/mL)
Antes da infecção	-	0
t = 0	9,0	$1,5 \times 10^9$
t = 1 dia	8,3	$2,3 \times 10^9$
t = 2 dias	16,7	$7,0 \times 10^6$
t = 7 dias	18,4	$2,5 \times 10^6$
t = 8 dias	20,9	$5,7 \times 10^5$
t = 9 dias	21,9	$3,0 \times 10^5$
t = 10 dias	19,0	$1,3 \times 10^6$
t = 11 dias*	19,9	$8,1 \times 10^5$
t = 12 dias	17,5	$3,4 \times 10^6$
t = 13 dias	17,0	$4,6 \times 10^6$
t = 14 dias*	20,7	$4,9 \times 10^5$
t = 15 dias*	19,1	$1,3 \times 10^6$

***Amostra coletada 24 horas após repique celular.**

Já os ensaios de ELISA executados com amostras de sobrenadante coletadas a partir dos ensaios de transfecção contendo o DNA viral nas formas de fita dupla (dsDNA) e fita simples (ssDNA) detectaram, respectivamente, a proteína Cap com índices de 0,6 e 0,93, ou seja, dentro do intervalo numérico definido pelas referências negativa (D. O. (densidade óptica) menor) e positiva (D. O. (densidade óptica) maior). As amostras de sobrenadante coletadas após o cultivo das células submetidas ao ensaio de infecção também mostraram a presença da proteína Cap com um valor de índice dentro do intervalo definido pelas referências negativa e positiva (Figura 20).

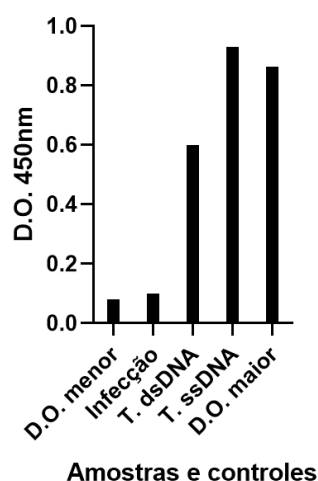


Figura 20. Gráfico de comparação das absorvâncias obtidas nos ensaios de ELISA. Os controles negativo e positivo são indicados, respectivamente, pelas barras de D. O. (densidade óptica) menor e maior. As D.O.s de infecção e transfecção com dsDNA (T. dsDNA) e ssDNA (T. ssDNA) apresentam um valor de índice dentro ou até superior ao intervalo definido pelas referências negativa e positiva.

Fonte: Ilustração gerada pelo programa *GraphPad Prism 8*.

Na análise de amostras por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) com coloração negativa, observaram-se partículas não envelopadas, poligonais e isométricas, com aproximadamente 20 nm de diâmetro, características típicas do circovírus suíno (TISCHER et al., 1982) (Figura 21A). Em algumas micrografias, essas partículas aparecem aglomeradas em grupos de três a cinco (Figura 21B).

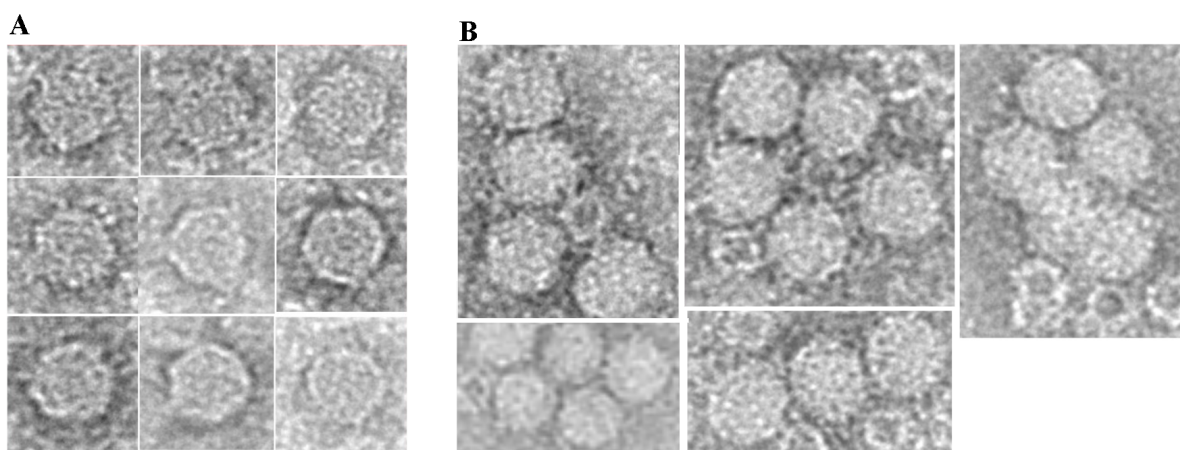


Figura 21. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Partículas não envelopadas, poligonais e isométricas de aproximadamente 20 nm de diâmetro encontradas isoladas (A) e aglomeradas (B).

Além disso, foi constatada a presença de partículas arredondadas com interior eletrodenso e aproximadamente 12 nm de diâmetro (Figura 22), semelhantes a ferritinas, uma forma de armazenamento do ferro (GROTTO, 2008). Também foram encontrados longos

filamentos livres na amostra, com aproximadamente 2,4 nm de diâmetro, compatíveis com fitas de DNA (Figura 23). A presença de possíveis partículas virais, material genético e ferritinas foi detectada em amostras obtidas tanto dos ensaios de transfecção com dsDNA e ssDNA, quanto dos ensaios de infecção.

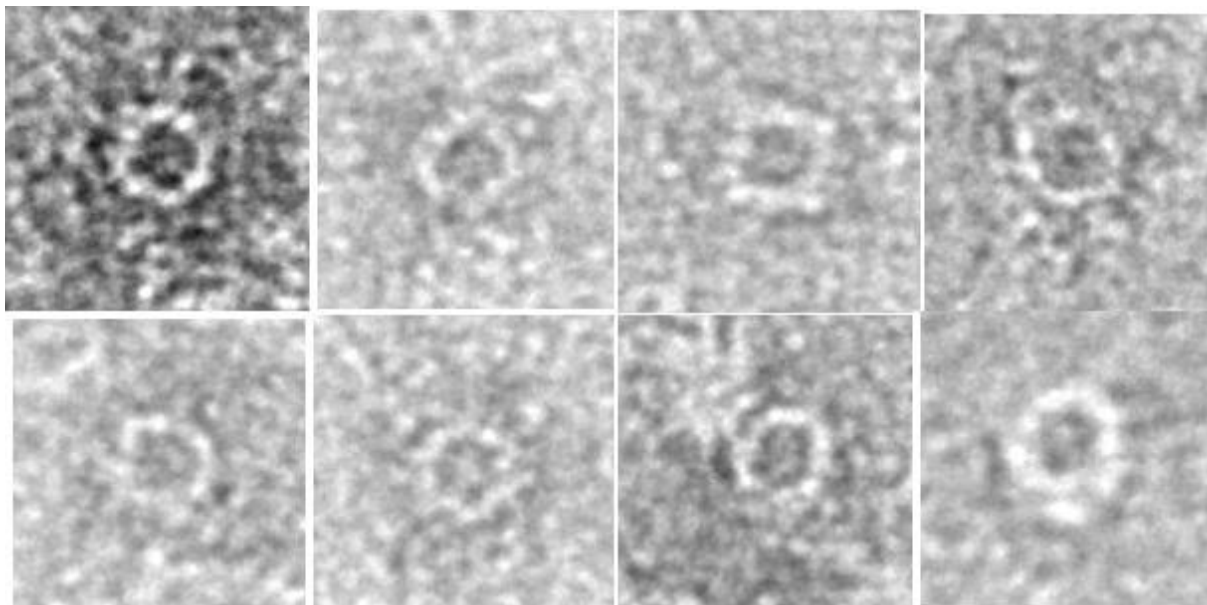


Figura 22. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Partículas circulares ocas de aproximadamente 12 nm, possivelmente ferritinas.

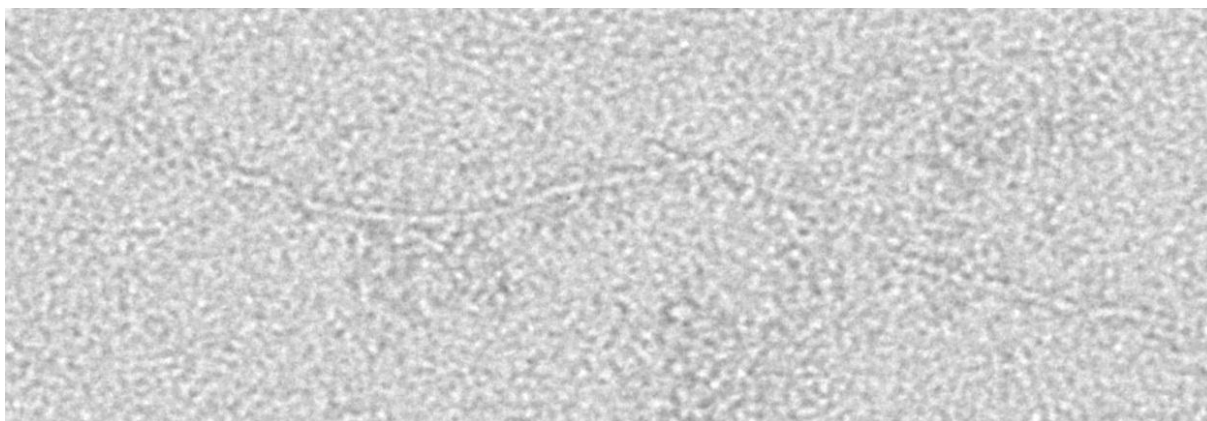


Figura 23. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Filamentos de aproximadamente 2,4 nm de diâmetro, possivelmente moléculas de DNA.

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 Bakteriolog 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.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Genótipo célula competente (baseado principalmente no documento de referência técnica de marcadores genéticos de cepas de *E. coli* da PROMEGA®)

E.coli JM109: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), relA1, supE44, D(lac-proAB), [F', traD36, proAB, laqI^qZΔM15], onde:

end A1: mutação da endonuclease I específica DNA. Melhora a qualidade dos isolamentos de DNA plasmidial.

rec A1: mutação na recombinação. Minimiza a recombinação do DNA introduzido com o DNA do hospedeiro com o DNA do hospedeiro, aumentando a estabilidade dos insertos. Os insertos são mais estáveis em recA1 do que em hosts recA13.

gyr A96: mutação da DNA girase. Confere resistência ao ácido malidíxico.

thi: mutação no metabolismo da tiamina (vit B1). Mutantes requerem tiamina para crescimento em meio mínimo.

hsdRd17 (r_k⁻, m_k⁺): restrição do DNA do hospedeiro e mutação do sistema de metilação. Restrição menos, modificação positiva para o sistema de metilação da cepa E coli K. Permite a clonagem sem clivagem do DNA transformado por restrição endógena por endonucleases.

rel A1: mutação ppGpp sintetase I. Permite a síntese de RNA na ausência de síntese de proteínas. O ribossomo associado ppGpp sintetase I pode detectar ribossomos com um tRNA não carregado no sítio A, um sinal de inanição.

supE44: mutações supressoras. Suprime as mutações âmbar (UAG).

F': cepa possui um epissomo F (fator de fertilidade), pode transportar lacI, lacZAM15 e um marcador de resistência a antibióticos. Permite a infecção do fago M13. Habilita a geração de ssDNA. Fio pili na ME. Denota abrigar genes adicionais no fator F.

tra D36: mutação do fator de transferência. Impede a transferência do epissomo F.

pro AB: mutação no metabolismo da prolina. Requer prolina para crescimento em meio mínimo.

lacI^q: superprodução da proteína repressora lac. Leva a altos níveis da proteína repressora lac, inibindo a transcrição do promotor lac.

laqI^qZΔM 15: deleção parcial do gene lacZ (β -galactosidase) que permite a complementação α . Permite a triagem azul/branca para colônias recombinantes quando semeadas em X-Gal/IPTG.

APÊNDICE B - Termos importantes:

Threshold: limiar de fluorescência estabelecido arbitrariamente dentro da fase exponencial de amplificação, idealmente localizado no meio da fase.

Ciclo threshold (Ct ou Cq): ciclo de quantificação, representa o número de ciclos necessários para a amostra alcançar o nível de fluorescência estabelecido pelo threshold.