

Circovírus suíno 2b: isolamento e taxa de mutação em linhagem de célula de macrófagos (J744)

Porcine circovirus 2b: isolations and mutation rate in J744 lineage macrophage cell

Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro^{1*}, Josete Garcia Bersano²,
Sheila Oliveira Silva Souza³, Renato Akio Ogata², Julia Mitico Nara², Leonardo José Richtzenhain³

RESUMO: *Porcine circovirus 2* (PCV2) está associado a vários sinais clínicos que são designados coletivamente como Circovirose e tem grande impacto na suinocultura. O isolamento viral é classicamente realizado em células da linhagem PK-15, contudo outras células têm sido testadas. Apesar dos avanços nos estudos com PCV2, o isolamento ainda é um desafio. Diante da dificuldade de manutenção dessas linhagens celulares comumente utilizadas associadas à necessidade do uso de substâncias tóxicas para o isolamento de PCV2, os objetivos do presente trabalho foram descrever o primeiro isolamento de *Porcine circovirus 2b* em linhagens de células de macrófago (J744) e verificar a taxa de mutação nesse sistema. Uma amostra de pulmão foi submetida ao sequenciamento e agrupada ao genótipo PCV2b. Essa amostra foi utilizada para inocular uma garrafa de J744 (com 30% de confluência em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino) e submetida a cinco passagens, as quais foram acompanhadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq). As cargas virais inicial e final foram de $2,90 \times 10^3$ e de $4,45 \times 10^8$ cópias de DNA/ μL para PCV2b, respectivamente. O sequenciamento confirmou o isolamento e descartou o coisolamento de mais de um genótipo. Após cinco passagens, o isolado apresentou identidade de 99,7%, com descrição de cinco mutações pontuais, uma sinônima e quatro não sinônimas, observadas nas regiões do gene *cap* e *rep*. Os resultados obtidos demonstram que as células J744 apresentam a susceptibilidade, e a instabilidade do vírus em J744 será importante para a compreensão do vírus.

PALAVRAS-CHAVE: doença; suíno; cultivo celular; evolução viral.

ABSTRACT: Porcine circovirus 2 (PCV2) is associated with various clinical signs that are collectively designated as Circovirose and has a great impact on the pig industry. The virus isolation is classically performed on PK-15 cell line, but other cells have been tested. Despite advances in studies with PCV2, isolation is still a challenge. The difficulty of maintaining these cell lines commonly used associated with the use of toxic substances to the isolation of PCV2 had stimulated the present study, that had the objectives to describe the first isolation of PCV2b in macrophage cell lines, J744 and verify the mutation rate at this system. A sample of lung was pooled and submitted to sequencing in which was classified in genotype PCV2b. This sample was used to inoculate a bottle of J744 with 30% of confluence in RPMI with 10% fetal bovine serum and submitted to five passages, which were accompanied by chain reaction quantitative polymerase (PCRq). The initial and final viral loads were 2.90×10^3 and 4.45×10^8 DNA copies/ μL for PCV2b, respectively. Sequencing confirmed the isolation and had eliminated possible co-isolation of more than one genotype. After five passages, the isolate showed 99.7% identity with description of five point of non-synonymous or/and synonymous mutations observed in the cap and rep gene. The results demonstrate that J744 cells exhibit susceptibility, and the instability of the virus in J744 will be important for understanding the virus.

KEYWORDS: disease; swine; cell culture; viral evolution.

¹Faculdade Metropolitanas Unidas, Campus Ponte Estaiada – São Paulo (SP), Brasil.

²Laboratório de Doenças de Suínos "Washington Sugay", Centro de Sanidade Animal, Instituto Biológico – São Paulo (SP), Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

*Autor correspondente: alessandramarnie@gmail.com

Recebido em: 27/11/2014. Aceito em: 05/10/2016

INTRODUÇÃO

Porcine circovirus 2 (PCV2) pertence ao gênero *Circovirus*, da família *Circoviridae*, e está associado a vários sinais clínicos que são designados coletivamente como *Circovirose*. O impacto na suinocultura é grande, uma vez que afeta o desempenho dos animais e, conseqüentemente, a produtividade da granja. O PCV2 apresenta dois principais genótipos, PCV2a e PCV2b, os quais se encontram amplamente disseminados na população suína, com prevalência que varia de 50 a 100% (SEGALÉS *et al.*, 2013).

Culturas de células animais são utilizadas em várias áreas de pesquisa, destacando-se o diagnóstico das infecções causadas pelos vírus, por meio do isolamento e da identificação desses agentes. A aplicação dos substratos celulares está diretamente correlacionada à susceptibilidade ao crescimento dos vírus e à capacidade do agente infectante de causar alteração celular denominada de efeito citopático (ECP) (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; CADORE *et al.*, 2009).

A susceptibilidade de culturas celulares à infecção por *Porcine circovirus* (PCV) foi investigada, inicialmente, com a espécie de *Porcine circovirus 1* (PCV1). Linhagens celulares semicontínuas e contínuas provenientes de bovinos, ovinos, aves, primatas (Vero) e humanos (Hep-2 e Hela), após tratamento com D-glucosamina, foram inoculadas com o PCV1, sendo todas susceptíveis à infecção, exceto as culturas celulares aviárias. No entanto, somente as culturas celulares derivadas de suínos e de células Vero tiveram aumento no número de células infectadas pelo PCV1 (ALLAN *et al.*, 1994).

PCV2 é o menor vírus animal descrito com capacidade de replicação autônoma em células de mamíferos, que ocorre, obrigatoriamente, durante a fase S da mitose, pois esse agente biológico depende de proteínas produzidas durante essa fase do ciclo celular. Essa característica deve ser considerada quando se pretende trabalhar com o isolamento, e a D-glucosamina é amplamente utilizada para induzir a fase S nas células, sendo recomendados a concentração de 300 mM e o período de incubação de 30 minutos (TISCHER *et al.*, 1982). Porém, em razão da natureza tóxica desse reagente, observa-se severa degeneração nas células infectadas e tratadas com D-glucosamina quando comparadas com as células infectadas e não tratadas (STEVENSON *et al.*, 1999).

O isolamento viral em cultivo celular de PCV2 é classicamente realizado em células da linhagem PK-15, originada de rim suíno, o qual é acompanhado pelas técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase indireta, contudo células PK-15 (ATCC-CCL-33) são persistentemente infectadas com PCV1, sendo necessário o uso de culturas celulares de PK-15 não infectadas com esse vírus, ou de células Vero, SK-6 (rim de suíno) e ST (testículo de suíno) para o isolamento viral (ALLAN; ELLIS, 2000).

Diante da dificuldade de isolar o PCV2b, a estabilidade genética *in vitro* é controversa. BRANDÃO *et al.* (2010) verificaram alta taxa de mutação com tendência para a seleção positiva no gene *cap* após três passagens, no entanto CRUZ *et al.* (2014) descreveram mutações pontuais após um número de passagens que variou de 6 a 17, dependendo do isolado, principalmente na região *cap* do genoma viral, que resultaram no desenvolvimento de CP em células ST. *In vivo*, a taxa de mutação é alta, sendo semelhante à dos RNA vírus, os quais puderam ser verificados com diversidade de genótipos descrita nos últimos anos. Apesar de os novos genótipos não terem sido testados experimentalmente quanto à patogenicidade, existem estudos que demonstram alterações de patogenicidade entre os isolados de PCV2b (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; SEGALÉS *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços nos estudos com PCV2, o isolamento ainda é um desafio. Diante da dificuldade de manutenção dessas linhagens celulares comumente utilizadas associadas à necessidade do uso de substâncias tóxicas para o isolamento de PCV2, os objetivos do presente trabalho foram descrever o primeiro isolamento de PCV2b em linhagens de células de macrófago (J744) e verificar a taxa de mutação nesse sistema.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para o isolamento, foi utilizada suspensão uma amostra de pulmão de suíno a 10% (p/v) em MEM (meio essencial mínimo — Gibco BRL) e armazenada em -80°C até o seu uso. A amostra foi sequenciada e classificada como PCV2b. Adicionalmente, essa amostra foi testada e considerada negativa para *Porcine circovirus 1* (PCV1), *Porcine parvovirus* (PPV), *Torque teno sus virus 1^a* (TTSu1a), *Torque teno sus virus k2* (TTSuVk2), *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), conforme descrito no item “Reações moleculares”.

Células

Garrafas de 75 cm² com monocamadas de células J744 na 58.^a passagem, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Universidade de São Paulo, foram tripsinizadas. Para isso, o meio de cultura de tecido animal (RPMI — Roswell Park Memorial, Cultilab, Brasil) foi removido, adicionou-se 1 mL de TrypLE™ Express (Gibco BRL, Brasil), e as garrafas foram incubadas por aproximadamente 2 minutos a 37°C. A tripsina foi retirada, e as células foram descoladas

e suspensas em meio RPMI, sendo, posteriormente, transferidas para garrafas de 25 mL ou 75 cm² (Corning, Estados Unidos), na concentração de $5 \text{ a } 7 \times 10^3$ células viáveis/mL (concentração inicial). Adicionou-se 10% de soro fetal bovino (SFB — Cultilab, Brasil), e incubou-se a 37°C em 5% de CO₂ até atingir 30% de confluência.

Isolamento

Foram utilizadas duas garrafas (25 cm²) de J744 com 30% de confluência em meio RPMI com 10% de SFB, sendo uma inoculada com PCV2b e outra com controle. Após 48 horas de incubação a 37°C em 5% de CO₂, as garrafas foram congeladas e descongeladas três vezes. O volume total (celular + sobrenadante) foi aliquotado, armazenado a -70°C e identificado como passagem 1. Uma alíquota de 500 mL desse material foi utilizada para inocular a nova garrafa (25 cm²), e esse procedimento foi repetido por três vezes. A partir de então, iniciou-se a expansão, em que 3 mL do isolado da terceira passagem foi utilizado para inocular uma garrafa de 75 cm². Finalmente, 6 mL da quarta passagem foram utilizados para inocular uma garrafa de 150 cm², sendo essa a quinta passagem (Fig. 1).

Reações moleculares

Extração de DNA

Uma alíquota de cada passagem do inóculo (n = 10) foi utilizada para a extração de DNA viral com o *kit* QIAamp cador Pathogen Mini (Qiagen, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante. O volume usado de cada amostra foi 200 µL, e ácido nucleico foi eluído em 100 µL de tampão. A pureza e a concentração de DNA foram obtidas pela razão das absorbâncias 260/280 (A_{260}/A_{280}) e por absorbância 260 nm, respectivamente, avaliadas por espectrofotometria utilizando NanoDrop 2000c Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). A razão das

absorbâncias foi considerada quando os valores estiveram entre 1,8 e 2,1.

Reação em cadeia pela polimerase

As amostras de pulmão e do isolamento final foram testadas para PCV1, PPV, TTVSu1a, TTSuVk2, *B. bronchiseptica*, *P. multocida* e *M. hyopneumoniae*. As PCRs foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de DNA extraído, 12,5 µL de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Estados Unidos), 50 pmoles de cada *primer* e água ultrapura q.s.p. Os controles negativos da reação e da extração consistiram de água ultrapura estéril. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (Bio-Rad MJ Research). Os controles positivos foram plasmídeos com os respectivos insertos para cada agente (BALDIN, 2012).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por meio de transiluminação do gel de agarose a 1,5% em luz ultravioleta, após sua coloração com GelRed (Biotium Inc., USA), conforme as instruções do fabricante. O tamanho do fragmento amplificado foi comparado ao padrão de 100 pb (Invitrogen, Estados Unidos) e fotodocumentado.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa

O DNA das amostras (n = 10) foi submetido à reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq). As reações foram realizadas com o par de *primers* SybPCV2F (5'ATA ACC CAG CCC TTC TCC TAC C 3') e SybPCV2R (5'GGC CTA CGT GGT CTA CAT TTC C 3'), que amplificaram um produto de 145 pb da região ORF2 (YANG *et al.*, 2007). A reação foi desenvolvida com o uso do *kit* DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante: em um volume de 16 µL com adição de 4 µL da amostra por reação. As condições de reação foram: 50°C/2 min, 95°C/2 min, 40 ciclos (94°C/1 min, 60°C/1 min e 72°C/1 min), seguidos de uma curva de dissociação de 95 a 60°C. O aparelho de PCR em tempo real utilizado foi One Step (Applied Biosystem, Estados Unidos). As amostras não foram processadas em duplicatas, mas as reações foram repetidas, no

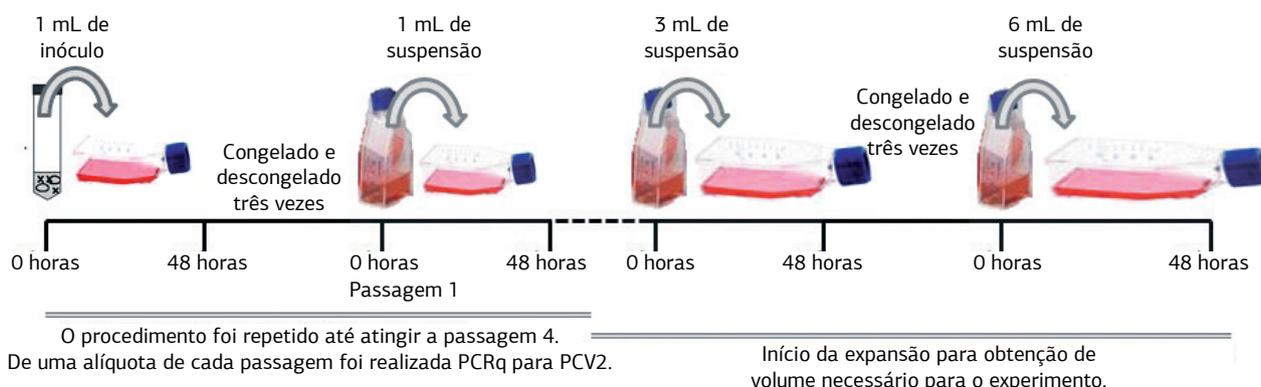


Figura 1. Ilustração do procedimento de isolamento e expansão de PCV2b em linhagem de célula de macrófago J744.

mínimo, duas vezes, independentemente da reprodutibilidade dos resultados. O controle negativo da reação consistiu de água ultrapura estéril. A curva padrão foi utilizada para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*) composta dos oito pontos, diluições seriadas na base 10, com número de cópias conhecido (10^9 a 10^2 cópias de DNA viral/ μ L).

A carga viral foi expressa por meio do número de cópias de DNA por mL de amostra do cultivo celular. Os dados de quantificação das diferentes amostras foram transformados em *log* da base 10 para análise descritiva.

Sequenciamento

A PCR para amplificação do genoma do PCV2 foi conduzida com os pares de *primers* P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8; estes amplificaram, respectivamente, fragmentos de 629, 630, 701 e 621 nt, que, quando sobrepostos, compreendem todo o genoma do PCV2. Em cada reação com volume final de 25 μ L foram adicionados 12,5 μ L de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 X) (Fermentas, Estados Unidos), 1 μ L de cada *primer* (P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8) a 10 pmol e 8 μ L de água DNase *free* q.s.p. e 2,5 μ L de DNA extraído (BALDIN, 2012).

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler MJ Research, Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos), nas seguintes condições: 94°C/5 min, seguido de 35 ciclos (94°C/30 s, 51°C/30 s e 72°C/1 min) e extensão final a 72°C/5 min.

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada conforme descrito. Os fragmentos amplificados de DNA-alvo, obtidos com os diferentes pares de *primers* (P1/P2, P3/P4, P5/P6 e P7/P8), foram submetidos à migração eletroforética em gel de agarose a 1,5% e purificados com o *kit* comercial SPIN-X® *centrifuge tube filters* (Costar, Corning Incorporated®, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante.

As amostras purificadas foram submetidas à reação de sequenciamento de DNA, sendo separadas para cada par de *primer*. As amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação pelo método EDTA-etanol (BALDIN, 2012).

Análise filogenética

A sequência consenso do genoma total de PCV2 de cada amostra foi obtida por intermédio do aplicativo Phred/Phrap (disponível *on-line* em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências de nucleotídeos das amostras foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW implementado pelo programa BioEdit versão 7.0.5, sendo comparadas com a sequência do GenBank (PCV1 AY193712; PCV2a AF055392; PCV2b AF055394; PCV2c EU148503), com base no estudo de OLVERA *et al.* (2007). Adicionalmente, as sequências recuperadas após cinco passagens foram comparadas com as dos inóculos para estudo de identidade utilizando o programa BioEdit versão 7.0.5.

RESULTADOS

Os DNA extraídos das células J744 não infectadas, dos controles negativos da extração e da PCRq foram negativos para PCV2. Todas as amostras foram negativas para PCV1, PPV, TTVSu1, TTSuVk2, *B. bronchiseptica*, *P. multocida* e *M. hyopneumoniae*.

As amostras negativas foram testadas para β -actina e foram positivas, descartando a possibilidade de falso-negativo.

As cargas virais inicial e final foram de $2,90 \times 10^3$ e de $4,45 \times 10^8$ cópias de DNA/ μ L para PCV2, respectivamente, demonstrando aumento e, conseqüentemente, o seu isolamento (Fig. 2). O PCV2 apresentou queda da concentração viral da primeira passagem em célula para a segunda e da terceira para quarta, a partir da qual não houve mais alteração na concentração viral.

O resultado do sequenciamento confirmou o isolamento de PCV2b e descartou a possibilidade de coisolamento de mais de um genótipo. A sequência de PCV2b, após cinco passagens, apresentou identidade de 99,7%, com descrição de cinco mutações. Mutações sinônimas foram observadas nas regiões dos genes *cap* (G1328A) e *rep* (A202G), respectivamente. Mutações não sinônimas ocorreram apenas na região do gene *rep*. Duas resultaram em substituições de aminoácidos do mesmo grupo, ou seja, G231A e V859L, enquanto a mutação de nucleotídeos T234A resultou na substituição de aminoácidos (I234N) pertencentes a grupos diferentes (Fig. 3).

DISCUSSÃO

A utilização de cultivos celulares é indispensável para a pesquisa de PCV2, permitindo a sua manutenção e multiplicação. O isolamento de PCV2 ainda é um desafio para a comunidade

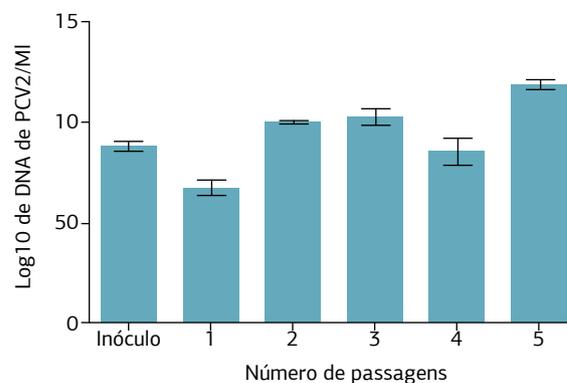


Figura 2. Valores médio de DNA de PCV2/ μ L (Log_{10}) e desvio padrão das passagens de PCV2b em célula J744 quantificado por reação em cadeia pela polimerase quantitativa.

científica, e a hipótese do presente trabalho, do uso de uma linhagem de macrófago (J744), surgiu diante da dificuldade existente em trabalhar com outras linhagens de células. A célula PK-15 é persistentemente infectada com o PCV1, sendo difícil a obtenção de células livres no Brasil. A célula ST, que é livre de PCV1, tem sido utilizada com êxito no isolamento de PCV2. No entanto, em ambas as linhagens celulares, o uso de solução de D-glucosamina, em diferentes concentrações, é necessário, e a natureza tóxica desse reagente resulta em degeneração das células (CRUZ, 2006).

Além do uso da D-glucosamina, outros protocolos foram testados. Entre eles, destacam-se o de técnica de superinfecção, interferon, concanavalina A, agentes lisossomotópicos (como a cloroquina e a monensina) e depleção de colesterol utilizando metil-beta-ciclodextrina (M β CD) (CRUZ; ARAUJO JR., 2014). O uso de célula J744 permitiu eliminar o uso de D-glucosamina, e os resultados demonstraram que o PCV2 se adaptou à célula J744, podendo ser promissora para o seu isolamento.

PCV2 não produz ECP, exigindo o emprego de técnicas que propiciem a confirmação do isolamento viral. A técnica de PCRq vem sendo utilizada para avaliar a carga viral de PCV2 em vários tipos de amostras, tais como tecidos, soro, sangue, fezes e secreções nasais, lacrimais, entres outros (OPRIESSNIG *et al.*, 2007). Essa ferramenta tem sido usada para demonstrar o isolamento viral, no entanto deve-se considerar que o isolamento viral é satisfatório quando ocorre a manutenção ou o aumento da quantidade do vírus em cada passagem, indicando, assim, que o vírus está se multiplicando na cultura de células. No presente trabalho, observou-se aumento da carga viral de $2,90 \times 10^3$ para $4,45 \times 10^8$ cópias de DNA/ μ L, com aumento do número de passagens, confirmando o isolamento viral. A queda da concentração viral da primeira para a segunda e da terceira para quarta passagem pode ser resultado da adaptação do vírus à célula. Queda de carga viral com subsequente recuperação também foi observada por CRUZ; ARAUJO JR. (2014).

Outro fator que deve ser considerado na escolha de célula é o comportamento do vírus. FENAUX *et al.* (2004) demonstraram que, depois de 120 passagens em célula, o

vírus PCV2 original sofreu duas mutações nucleotídicas que levaram à atenuação da virulência *in vivo*. Resultados semelhantes foram observados por HASSLUNG *et al.* (2005), no entanto os resultados obtidos por RAMAMMORTHY *et al.* (2011) sugerem que uma sequência *interferon-stimulated response elemento* (ISRE), localizada na origem de replicação do PCV2, desempenhou papel importante na indução da patogenia, com impacto negativo sobre a replicação desse vírus. Entretanto, a mutação da sequência pareceu diminuir a magnitude das lesões patológicas aos 21 dias após infecção (dpi), mas aumentou o tempo de eliminação viral e causou uma infecção mais grave aos 28 dpi, quando comparada ao outro tipo de PCV2 utilizado no experimento.

No presente estudo, após cinco passagens, observaram-se mutações nas regiões dos genes *cap* e *rep*. A proteína do capsídeo, codificada pelo gene *cap*, desempenha papel importante no receptor de ligação vírus-célula. O polimorfismo na estrutura primária dessa proteína observada no presente estudo pode ser interpretado como resultado da adaptação do vírus aos receptores de membrana de célula J744. No entanto, mutação na região do gene *rep* é menos comum, uma vez que essa região é responsável pela codificação de proteínas envolvidas na replicação. As duas substituições de aminoácidos do mesmo grupo (G231A e V859L) não alteraram a estrutura secundária da proteína, não interferindo na sua função, porém a substituição de aminoácidos (I234N) pertencentes a grupos diferentes pode ter interferido na estrutura secundária e, conseqüentemente, em sua função. A substituição ocorreu na região codificadora da proteína *rep* e, no presente trabalho, nenhuma alteração da replicação viral celular foi observada. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar o real impacto dessa mutação. Os resultados obtidos são semelhantes aos observados por BRANDÃO *et al.* (2010). No presente trabalho, os autores relataram diferença de comportamento do vírus em linhagens de célula suína e de outra espécie animal. As mutações na região *rep* foram mais frequentes na linhagem celular Vero quando comparada com ST, cujas mutações se concentraram na região *cap*. Esses resultados diferem dos observados por CRUZ *et al.* (2014), em que as mutações foram, em sua maioria, não silenciosas na região do gene *cap*. As mutações

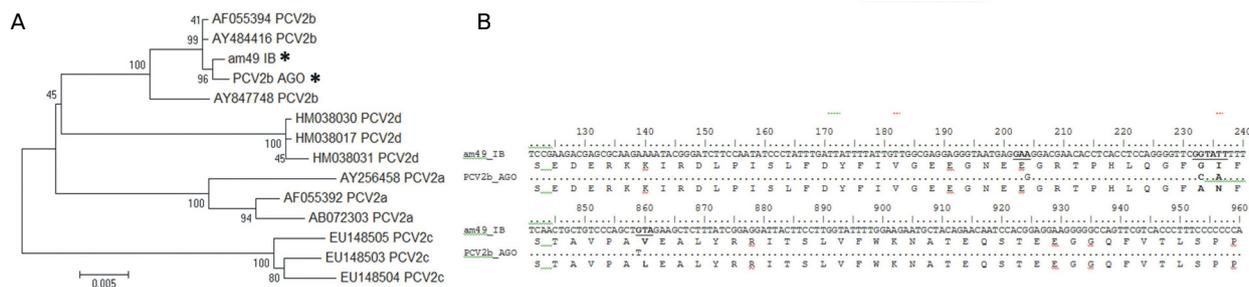


Figura 3. A) Árvore filogenética de sequências completas de PCV2 construída pelo algoritmo *Neighbor-joining*. Os números representam os valores de *bootstrap* (1.000 réplicas). *Sequências do inóculo (am49 IB) e isolado após cinco passagens (PCV2b AGO); B) alinhamento de amostras de inóculo e isolado de PCV2b. Os pontos indicam resíduos idênticos. Regiões onde se encontram as mutações estão grifadas.

induziram o ECP em cultivo celular, algo até então nunca visto em isolamento de PCV2.

do vírus em J744 é importante para a melhor compreensão do vírus.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que PCV2b pode ser isolado em linhagem de célula de macrófago J744, dispensando o uso de D-glucosamina, sendo uma alternativa para o cultivo do vírus. A instabilidade

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o auxílio (Processo nº 2007/57115-3) e a Bolsa Jovem Pesquisador concedida a Alessandra M. M. G. de Castro (Processo nº 2009/09175-2).

REFERÊNCIAS

- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviroses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, p.3-14, 2000.
- ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; McNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, v.41, n.1, p.17-26, 1994.
- BALDIN, C.M. *Avaliação da transmissão horizontal e descrição da patogenia em leitões experimentalmente infectados com Circovírus suíno 2*. 2012. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BRANDÃO, E.P.; SOUZA, S.P.; CASTRO, M.M.G.; RICHTZENHAIN, L.J. The *Cap* gene of porcine circovirus type 2 (PCV2) evolves by positive selection *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.47, n.3, p.209-212, 2010.
- CADORE, G.C.; VOGEL, F.S.F.; FLORES, E.F.; SANGIONI, L.A.; CAMILLO, G. Suscetibilidade de linhagens celulares e cultivos primários ao *Neospora caninum*. *Ciência Rural*, v.39, n.5, p.1581-1585, 2009.
- CRUZ, T.F.; ARAUJO JR., J.P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. *Journal of Virological Methods*, v.196, p.82-85, 2014.
- CRUZ, T.F.; CASTRO, A.M.M.G.; PEDRAZA-ORDONES, F.J.; RICHTZENHAIN, L.J.; ARAUJO JR., J.P. PCV2b presenting amino acid mutations in the capsid determines enhanced replication in swine testicle cells. Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society Congress, Cancun, México. p.526. 2014.
- CRUZ, T.F. *Quantificação do circovírus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões*. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *Journal of Virology*, v.78, p.3440-3446, 2004.
- HASSLUNG, F.; WALLGREN, P.; LADEKJAER, A.S.; BOTNER, A.; NIELSEN, J.; WATTRANG, E.; ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; TIMMUSK, S.; BELÁK, K.; SEGALL, T.; MELIN, T.; FOSSUM, C. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.49-60, 2005.
- OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology*, v.357, p.175-185, 2007.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUS, P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestation, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*, v.19, p.591-615, 2007.
- RAMAMMORTHY, S.; OPRIESSNIG, T.; PAL, N.; HUANG, F.F.; MENG, X.J. Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. *Veterinary Microbiology*, v.147, p.49-58, 2011.
- SEGALÉS, J.; KEKARAINEN, T.; CORTEY, M. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Veterinary Microbiology*, v.165, n.1-2, p.13-20, 2013.
- STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K.; KANITZ, C.L. Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Veterinary Pathology*, v.36, n.5, p.368-378, 1999.
- TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, v.295, n.5844, p.64-66, 1982.
- YANG, Z.Z.; HABIB, M.; SHUAI, J.B.; FANG, W.H. Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v.8, n.3, p.162-169, 2007.