CÍNTIA MARIA FAVERO

**Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus 1*
e 2 circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e Porco
Monteiro do Pantanal**

São Paulo

2014

CÍNTIA MARIA FAVERO

**Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus 1*
e 2 circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e Porco
Monteiro do Pantanal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3003
FMVZ

Favero, Cíntia Maria

Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus* 1 e 2 circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e porco Monteiro do Pantanal / Cíntia Maria Favero. -- 2014.
112 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Torque teno virus suíno. 2. Diarreia. 3. Vacinação contra o PCV2. 4. Porco Monteiro. 5. Recombinação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa e caracterização genética de amostras do torque teno sus vírus 1 e 2 circulantes em suínos do Estado de São Paulo", protocolado sob o nº 2042/2010, utilizando amostras biológicas de suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/10/2010.

We certify that the Research "Search and genetic characterization of torque teno sus virus 1 and 2 circulating in pigs from São Paulo State", protocol number 2042/2010, under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/27/2010.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FAVERO, Cíntia Maria

Titulo: Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus 1 e 2* circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e Porco Monteiro do Pantanal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos animais, amor incondicional.

Agradecimentos

À Deus por iluminar meu caminho.

Aos meus pais por todo apoio e ajuda que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu irmão pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Leonardo Richtzenhain, meu orientador, que me acolheu em seu laboratório, acreditou em meu trabalho, me ajudou sempre que precisei e pelo exemplo. À Dr^a. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro pela amizade, por acreditar em mim, pela oportunidade de trabalhar com o TTSuV, por me acolher em seu grupo, por toda a ajuda com projeto.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Reinemman que me colocou em contato com o VPS, por toda a ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão pelas oportunidades, por ter me apresentado ao maravilhoso mundo dos congressos internacionais e por toda a ajuda.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira pelas solicitações atendidas junto à pós-graduação. À Prof^a. Dr^a Zélia Inês Portela Lobato (Escola de Veterinária da UFMG) por me receber em seu laboratório e me orientar no mestrado, pelos três anos de convivência em que passei a gostar ainda mais da pesquisa e pelo exemplo.

Às amigas Cíntia Manzato Baldin (Xuxulete) e Karen Ferrari por toda a ajuda neste trabalho, coleta e processamento das amostras e momentos de descontração.

Às amigas Gijhelly (Giselle Ayres), Suellen (Sueli Santos), Crodete (Cláudia Niemeyer) pelos momentos divertidíssimos juntas, jantares, conversas sérias e outras nem tanto, por dez vem em quando me deixarem falar, o que é muito difícil quando estamos reunidas, adoro vocês.

Às amigas Bolas (Luciana Ayres e Ana Lúcia Reis), Cláudia Bete, Fernanda Campos, Rose Piovezan pela amizade que começou há muito tempo e fica cada vez melhor mesmo a distância, adoro vocês.

Aos amigos de BH que nunca vou esquecer Felipe Masiero Salvarani, Fábiana Souza Campos, Tércia Oliveira, Ana Carolina de Matos, Elaine Dorneles, Giovana Ivo, Moisés Freitas, Catarina Dourado, Telma Alves, muitas saudades.

À amiga Lilian Pain e Gutemberg Barone por terem me recebido com tanto carinho em sua casa em Tóquio e disponibilizado seu tempo para me levar conhecer lugares incríveis. Aos amigos do laboratório de Doenças Parasitárias, Herbert Soares (irmão), Marcos Lopes (Piauí), Amália Barbieri, Jonas, João Fábio, Tiago, Arlei e Fernanda, pela ajuda e muitas risadas.

Aos amigos do Proibidão (Vasco, Nara, Laila, Juju) que fazem meu dia mais feliz. À amiga Sheila Souza Oliveira pela amizade, sem a sua ajuda a realização deste trabalho não seria possível.

À Sueli Taniwaki pelos ensinamentos com a clonagem e toda a ajuda durante a execução do projeto.

Ao Dr. Ubiratan Piovezan (Embrapa – Pantanal) e Matias Szabo (Universidade Federal de Uberlândia) pela concessão das amostras de Porco Monteiro.

À Tânia Allen Coutinho e Simone Myashiro pela concessão de amostras de fetos e fezes. Às amigas do LABMAS Fernanda Dornelas, Patrícia Fillipsen, Carolina Alejo e Aline da Hora por toda a ajuda, conversas e momentos de descontração.

À Sandra Sanches e Alexandre Sanches pela disponibilidade em ajudar, incentivo, conversas e amizade.

À Tânia Delonero pela ajuda com a pós-graduação sempre que precisei.

Às bibliotecárias Evadne, Sandra e Natália por toda ajuda com a formatação da tese. À Gisele Oliveira e Zenaide, funcionárias do Laboratório de Zoonoses pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários da secretaria Danival Lopes, Cristina Paick e Virgínia pela atenção e ajuda durante esses quatro anos de VPS.

Aos funcionários Carol, Claudinha, Pedrinho (Peter) e Renatinho sempre bem humorados e prestativos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

Passagem das Horas

"Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero.

...

Viajei por mais terras do que aquelas em que toquei...
Vi mais paisagens do que aquelas em que pus os olhos...
Experimentei mais sensações do que todas as sensações que senti,
Porque, por mais que sentisse, sempre me faltou que sentir
E a vida sempre me doeu, sempre foi pouco, e eu infeliz.

...

Não sei se a vida é pouco ou demais para mim.
Não sei se sinto de mais ou de menos, não sei...

...

Vi todas as coisas, e maravilhei-me de tudo,
Mas tudo ou sobrou ou foi pouco - não sei qual - e eu sofri.
Vivi todas as emoções, todos os pensamentos, todos os gestos,
E fiquei tão triste como se tivesse querido vivê-los e não conseguisse.
Amei e odiei como toda gente,
Mas para toda a gente isso foi normal e instintivo,
E para mim foi sempre a exceção, o choque, a válvula, o espasmo.

...

Sentir tudo de todas as maneiras,
Viver tudo de todos os lados,
Ser a mesma coisa de todos os modos possíveis ao mesmo tempo,
Realizar em si toda a humanidade de todos os momentos
Num só momento difuso, profuso, completo e longínquo.

...

Eu quero ser sempre aquilo com quem simpatizo,

...

Meu ser elástico, mola, agulha, trepidação ...

Álvaro de Campos

RESUMO

FAVERO, C. M. **Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus 1* e *2* circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e Porco Monteiro do Pantanal** [Search and genetic characterization of *Torque teno sus virus 1* and *2* circulating in domestic pigs from São Paulo state and Porco Monteiro from Pantanal]. 2014. 105f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O Torque teno vírus suíno é classificado como pertencente à família *Anelloviridae* gênero *Iotatorquevirus* que compreende as espécies: *Torque teno sus virus 1a* (TTSuV1a) e *Torque teno sus virus 1b* (TTSuV1b); e o gênero *Kapatorquevirus* que compreende apenas a espécie *Torque teno sus virus k2* (TTSuVk2). O TTSuV foi identificado como potencial agente causador de falhas reprodutivas em porcas, como agente desencadeante nos quadros de doenças associadas ao circovírus suíno tipo 2 (PCVAD) e em associação com outros agentes como o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV), vírus da influenza suína (SIV) e *Mycoplasma hyopneumoniae* como co-agentes na manifestação clínica do complexo respiratório suíno (PRDC). No presente estudo foi utilizada uma PCR direcionada a região não traduzida do genoma viral (UTR), e foi investigado um total de 391 amostras divididas entre fetos abortados e mumificados, leitões natimortos, soro, fezes e pulmão de suínos de dez propriedades localizadas no Estado de São Paulo. Diferenças entre as frequências do TTSuV1 e do TTSuVk2 foram comparadas entre amostras de porcas com problemas reprodutivos (fetos abortados e mumificados e leitões natimortos), diferentes fases da criação de suínos (porcas, leitões da creche e crescimento), leitões apresentando ou não diarreia, entre animais da terminação vacinados ou não contra o PCV2 e ainda entre amostras positivas e negativas para o PCV2. Amostras positivas de pulmão de suíno e um pool de soro de Porco Monteiro do Pantanal foram submetidos a uma PCR para amplificação da ORF1 de ambos os gêneros do TTSuV, seguida pela clonagem e posterior sequenciamento para reconstrução da filogenia. Foi investigada a ocorrência de eventos de recombinação entre as amostras, pressão de seleção e propriedades da proteína relacionadas à ligação com anticorpos. O TTSuVk2 foi mais presente infectando tanto fetos abortados quanto leitões natimortos. Porcas e leitões da creche foram mais frequentemente infectados pelo TTSuV1 enquanto que leitões do crescimento pelo TTSuVk2. A coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) foi mais frequente em amostras fecais diarreicas que nas não diarreicas. Animais da terminação

apresentaram alta frequência de coinfecção (TTSuV1 + TTSuVk2), sendo ainda maior na associação com o PCV2. A filogenia construída pelo método *neighborjoining* baseada na sequência da ORF1 revelou existir quatro tipos do TTSuV1 (1a, 1b, 1c e 1d) e sete subtipos do TTSuVk2 (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) circulantes nas populações de suínos domésticos e ferais do Brasil. Entre as estirpes virais circulantes foram detectados eventos de recombinação intra-hospedeiro, inter-hospedeiro, intra-genótipo e inter-genótipo. A região carboxi-terminal da proteína demonstrou agrupar características relacionadas à ligação com anticorpos. Este estudo é o primeiro a caracterizar geneticamente amostras de TTSuV circulantes em suínos domésticos e ferais do Brasil e contribui para um melhor entendimento sobre a epidemiologia do vírus.

Palavras chave: Torque teno vírus suíno. Diarreia. Vacinação contra o PCV2. Porco Monteiro. Recombinação.

ABSTRACT

FAVERO, C. M. **Search and genetic characterization of *Torque teno sus virus 1* and 2 circulating in domestic pigs from São Paulo state and Porco Monteiro from Pantanal** [Pesquisa e caracterização genética de amostras do *Torque teno sus virus 1* e 2 circulantes em suínos domésticos do estado de São Paulo e Porco Monteiro do Pantanal]. 2014. 105f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The porcine torque teno virus is classified within the *Anelloviridae* family, genus *Iotatorquevirus* comprising the species: *Torque teno sus virus 1a* (TTSuV1a) and *Torque teno sus virus 1b* (TTSuV1b). The genus *Kapatorquevirus* comprises only one species, the *Torque teno sus virus k2* (TTSuVk2). TTSuV was identified as a potential agent of reproductive failure causes in sows, as a trigger agent associated with porcine circovirus associated diseases (PCVAD) and in combination with other agents such as porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV), swine influenza virus (SIV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* as a co-agent in the clinical manifestation of porcine respiratory disease complex (PRDC). In this study, PCR targeting the untranslated region (UTR) of the virus genome was used to investigate a total of 391 samples within aborted and mummified fetuses, stillborn piglets, serum, feces and lungs of pigs from ten different properties located at São Paulo State. Differences between frequencies of TTSuV1 and TTSuVk2 were compared among samples of sows with reproductive failure (aborted and mummified fetuses and stillborn piglets), different phases of pig breeding (sows, nursery and growing piglets), samples from piglets with diarrhea or not, finishing pigs vaccinated or not against PCV2 and between positive and negative samples for PCV2. Positive lung samples from pigs and a pool of sera from feral pigs were used to PCR amplification for the ORF1 of both genera of TTSuV, followed by cloning and subsequent sequencing to reconstruct the phylogeny. The occurrence of recombination events among the samples, selection pressure and protein-related antibodies binding properties was investigated. The TTSuVk2 was more frequent infecting both aborted fetuses as stillborn piglets. Sows and nursery piglets were frequently more infected by TTSuV1 while growing piglets by TTSuVk2. The coinfection (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) was more frequent in diarrheic stool samples than in the non-diarrheic. Finishing pigs showed high frequency of coinfection (TTSuV1 + TTSuVk2) and an increase of the coinfection in association with PCV2. Phylogeny constructed by neighborjoining method based on the ORF1 sequence

revealed the existence of four types TTSuV1 (1a, 1b, 1c and 1d) and seven subtypes of TTSuV2 (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) circulating within populations of domestic and feral pigs in Brazil. Among circulating viral strains, intra-host, inter-host, intra-and inter-genotype recombination events were detected. The carboxy-terminal region of the protein showed the have characteristics related with antibodies binding activity. This study is the first to genetically characterize samples of TTSuV circulating in domestic and feral pigs from Brazil and contributes to a better understanding of the epidemiology of the virus.

Keywords: Torque teno sus virus. Diarrhea. Vaccination against PCV2. Porco Monteiro. Recombination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do TTSuV indicando os quadros abertos de leitura (ORF) e região não traduzida (UTR).....	28
Figura 2 – Fluxograma de trabalho.....	28
Figura 3 – Diagrama esquemático da região de hibridização dos pares de <i>primers</i> TTV1F, TTV1R TKR, TTV2F TAK e TTV2R TKR, para amplificação parcial do genoma do TTSuV1 e do TTSuVk2.	39
Figura 4 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções em amostras de fetos suínos abortados, mumificados e leitões natimortos provenientes de granjas do Estado de São Paulo	46
Figura 5 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções em amostras de fezes de leitões em fase de creche e crescimento e soro de porcas provenientes de granjas do Estado de São Paulo.....	48
Figura 6 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções em amostras de fezes de leitões com e sem diarreia, provenientes de granjas do Estado de São Paulo.	49
Figura 7 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções em amostras de pulmão de animais vacinados e não vacinados para o PCV2, provenientes de granjas do Estado de São Paulo.....	51
Figura 8 – Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuV1 e do TTSuVk2 construída pelo método <i>neighborjoining</i> , tendo <i>p-distance</i> como modelo de substituição e 1000 repetições de bootstrap.....	51
Figura 9 – Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuV1 construída pelo método <i>neighborjoining</i> , tendo <i>p-distance</i> como modelo de substituição e 1000 repetições de <i>bootstrap</i>	55
Figura 10 – Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuVk2 construída pelo método <i>neighborjoining</i> , tendo <i>p-distance</i> como modelo de substituição e 1000 repetições de <i>bootstrap</i>	58

Figura 11 – Resultado do evento de recombinação detectado para a sequência TTSuV1 PM C22 pelo programa RDP4 após pesquisa pelos algoritmos RDP, Geneconv, Bootscan, MaxChi, Chimera e 3Seq..... 63

Figura 12 – Dendrograma baseado no método de distância para a região do alinhamento sem o fragmento recombinante (A) e com o fragmento recombinante (B) da sequência do TTSuV1 PM C22 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de amostras utilizadas para detecção do TTSuV1 e TTSuVk2	37
Tabela 2 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de tecidos de fetos abortados e mumificados e leitões natimortos	45
Tabela 3 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de fezes de leitões em fase de creche e crescimento e soro de porcas.....	46
Tabela 4 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de fezes de leitões em fase de creche e crescimento com e sem diarreia	48
Tabela 5 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de pulmão de animais vacinados e não vacinados contra o PCV2	50
Tabela 6 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1905 nt) de 32 sequências do TTSuV1 e 25 sequências do TTSuVk2 do presente estudo e 4 amostras de referência (AB076001 = 1a; AY823990 = 1b; AY823991 = 2a; JQ406844 = 2b) disponíveis no Genbank.....	53
Tabela 7 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1908 - 1950 nt) de 32 sequências do TTSuV1 provenientes de 12 amostras do presente estudo e 39 amostras disponíveis no Genbank.....	56
Tabela 8 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1863 - 1896 nt) de 25 sequências do TTSuVk2 provenientes de 13 amostras do presente estudo e 47 amostras disponíveis no Genbank.....	59
Tabela 9 – Identidade mínima e máxima de amoniácidos do alinhamento da ORF1 (636 - 650 aa) de 32 sequências do TTSuV1 provenientes de 12 amostras do presente estudo e 39 amostras disponíveis no Genbank.....	68
Tabela 10 – Identidade mínima e máxima de aminoácidos do alinhamento da ORF1 (621 - 632 aa) de 25 sequências do TTSuVk2 provenientes de 13 amostras do presente estudo e 47 amostras disponíveis no Genbank.....	70
Tabela 11 – Características da proteína relacionadas à exposição de epítomos na superfície.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência dos pares de iniciadores senso e anti-senso para detecção de TTSuV1 e TTSuVk2.....	34
Quadro 2 - Sequência dos pares de iniciadores senso e anti-senso utilizados na amplificação de um fragmento de 2700 pb do TTSuV1 e 2144 pb do TTSuVk2	39
Quadro 3 - Sequência dos iniciadores senso utilizados no sequenciamento do TTSuV1 e do TTSuVk2.....	41
Quadro 4 - Amostras de pulmão e soro que tiveram a ORF1 do TTSuV sequenciada e os respectivos genótipos encontrados.....	60
Quadro 5 - Eventos de recombinação detectados em amostras de suíno doméstico e porco monteiro, utilizando seis algoritmos implementados pelo programa RDP4	62
Quadro 6 - Análise da pressão de seleção e respectivas posições dos códons da ORF1 onde foi identificada pressão positiva.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV	Vírus da doença de Aujeszky
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
DEPC	Dietil-pirocarbonato
d _N	Taxa de mutações não sinônimas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
d _S	Taxa de mutações não sinônimas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
GARD	Genetic Algorithms for Recombination Detection
HVR	Região hipervariável
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
ORF	Quadro aberto de leitura
PASC	Pairwise Sequence Comparison
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PCVAD	Doenças associadas ao circovírus suíno
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Porco Monteiro
pmol	Picomol
PRDC	Complexo respiratório suíno
PRRSV	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RCR	Replicação em círculo rolante
RDP4	Recombination Detection Program
RNA	Ácido ribonucleico
SIV	Vírus da Influenza suína
ssDNA	fita simples de ácido desoxirribonucleico
TE	Tampão TRIS/EDTA
TRIS	Hidroximetil aminometano
TTSuV	Torque teno vírus suíno
TTSuV1	<i>Iotatorquevirus</i>
TTSuVk2	<i>Kappatorquevirus</i>
U	Unidade Internacional
UTR	Região não traduzida
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
>	Maior
<	Menor

PMWS	Síndrome do definhamento multissistêmico suíno
PCV2-SD	Doença sistêmica associada ao PCV2
PDNS	Síndrome dermatite nefropatia suína
PCV2-SI	Infecção subclínica associada ao PCV2
PCV2-ED	Doença entérica associada ao PCV2
PCV2-LD	Doença pulmonar associada ao PCV2
PCV2-RD	Doença reprodutiva associada ao PCV2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	DESCOBERTA DO TORQUE TENO VÍRUS	33
2.2	CLASSIFICAÇÃO E TAXONOMIA.....	36
2.3	GENOMA, PROTEÍNAS VIRAIS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	38
2.4	EPIDEMIOLOGIA.....	40
2.5	ASSOCIAÇÃO COM OUTROS AGENTES E DOENÇA	42
2.6	VARIABILIDADE GENÉTICA.....	42
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	33
4.2	PCR PARA DETECÇÃO DO TTSUV1 E DO TTSUVK2 EM AMOSTRAS DE CAMPO	36
4.2.1	Amostras.....	36
4.2.2	Extração do DNA.....	38
4.2.3	Controle endógeno da extração	40
4.2.4	Controles da PCR	42
4.2.5	Condições da reação	42
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.4	AMPLIFICAÇÃO DA ORF1 DO TTSUV1 E DO TTSUVK2.....	38
4.5	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ORF1 DO TTSUV1 E DO TTSUVK2.....	40
4.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA	42
4.7	DETECÇÃO DE POTENCIAIS EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO	42
4.8	ANÁLISE DA PRESSÃO DE SELEÇÃO	42
4.9	CARACTERIZAÇÃO DOS MOTIVOS DE AMINOÁCIDOS DA ORF1 E PROPRIEDADES DA PROTEÍNA.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	DETECÇÃO DO TTSUV1 E DO TTSUVK2 EM AMOSTRAS DE CAMPO, COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5.2	AMPLIFICAÇÃO DA ORF1, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	51
5.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	51
5.4	DETECÇÃO DE POTENCIAIS EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO	60
5.5	ANÁLISE DA PRESSÃO DE SELEÇÃO	60

5.6	CARACTERIZAÇÃO DOS MOTIVOS DE AMINOÁCIDOS DA ORF1 E PROPRIEDADES DA PROTEÍNA.....	68
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína animal mais consumida mundialmente. Em 2012 foram produzidas 104,363 milhões de toneladas de carne suína, sendo que a China foi a responsável por 49 % deste total, seguido pela União Européia (22 %), Estados Unidos (10 %) e demais países (19 %) (GERVÁSIO, 2013). Deste total, o Brasil foi responsável pela produção de 3,49 milhões de toneladas do produto. Atualmente, o país representa 10 % do volume exportado de carne suína no mundo, com lucros contabilizados de mais de US\$ 1 bilhão por ano (MAPA, 2014). Os principais produtores são os estados da região sul, seguido por Minas Gerais e Mato Grosso, sendo que São Paulo representa o sexto maior produtor do país (ABIPECS, 2012).

A alta demanda de consumo de proteína animal vem fazendo com que haja uma intensificação na produção de suínos que juntamente com um movimento internacional maior de produtos resulta na emergência de doenças que desafiam a suinocultura. De 1991 a 2009 quatorze novos vírus emergiram na população de suínos entre eles o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV), o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), vírus da hepatite E suína (SHEV), torovírus suíno (PToV), Nipah vírus (NiV), torque teno vírus suíno (TTSuV) e o bocavírus suíno (PBoV) (MENG, 2012).

O Circovírus suíno tipo 2 foi associado a síndrome do definhamento em suínos pela primeira vez em 1998 (ALLAN et al., 1998) e desde então uma série de manifestações clínicas foram atribuídas a infecção pelo PCV2, como problemas reprodutivos, doença respiratória, enterite e síndrome dermatite nefropatia suína (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). É seguramente o agente que causa maior impacto econômico na indústria suína de todo o mundo não somente pela manifestação de doença clínica, mas principalmente pela infecção subclínica que resulta em menor peso ao abate (ALARCON; RUSHTON; WIELAND, 2013).

Pelo fato do circovírus suíno ser um agente com a capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro, considera-se que na manifestação clínica a infecção pelo PCV2 seja necessária, mas não o suficiente (KEKARAINEN et al, 2010; SEGALÉS, 2012). Sendo assim a infecção simultânea com outros agentes, como por exemplo, o TTSuV tem despertado o interesse de pesquisadores . A infecção pelo TTSuV1 foi associada ao complexo respiratório suíno (PRDC) (RAMMOHAN et al.,

2012), ao aumento da severidade de lesões pulmonares em animais vacinados contra PRRSV e desafiados e também à supressão vacinal (ZHANG et al., 2012). Já o TTSuVk2 foi demonstrado estar infectando mais frequentemente animais com doença sistêmica associada à infecção pelo PCV2 (KEKARAINEN; SIBILA; SEGALÉS, 2006; BLOMSTRÖM et al., 2010; ARAMOUNI et al., 2011).

Desde a sua descrição em 2002, a infecção pelo TTSuV em suínos foi relatada em países da Europa, América do Norte, Ásia e África (SEGALÉS et al., 2009; TAIRA et al., 2009, WU et al., 2011; BRINK et al., 2012), sendo que no Brasil a primeira descrição ocorreu em 2005 (NIE; DINIZ-MENDES; DEVALLE 2005). A partir daí somente quatro trabalhos foram publicados sobre o assunto avaliando a frequência de infecção dos dois gêneros do vírus em amostras de soro, fezes e tecidos de animais de diferentes idades (CASTRO et al., 2012; DE ARRUDA LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2012; DE ARRUDA LEME et al., 2013).

Na literatura são propostas duas espécies (1a e 1b) que agrupam três tipos para o TTSuV1 (1a, 1b, 1c) e uma espécie (2a) que agrupa sete subtipos (2a, 2b, 2c, 2d, 2e e 2f) para TTSuVk2 (LI et al., 2013). Até agora, foram caracterizadas somente duas sequências completas do TTSuV de amostras brasileiras, uma pertencendo ao tipo 1b (AY823990) e outra ao subtipo 2a (AY823991) (NIEL; DINIZ-MENDES; DEVALLE, 2005), e portanto, não se sabe quais os genótipos circulantes no país.

O sequenciamento da ORF1 (quadro aberto de leitura) do TTSuV, a região do genoma do TTSuV que codifica uma proteína do capsídeo, permite a classificação genotípica das amostras já que mostrou ser representativa do genoma completo na análise da variabilidade genética dos Anellovirus que infectam animais (BIAGINI, 2009; HUANG et al., 2010, CORNELISSEN-KEIJERS et al., 2012). Além disso, como essa proteína tem participação na resposta imunológica do hospedeiro, a caracterização molecular dessa região fornece ferramentas importantes para o desenvolvimento de testes diagnósticos bem como para o entendimento da patogenia e os mecanismos que o vírus utiliza para se evadir do sistema imune estabelecendo infecção crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESCOBERTA DO TORQUE TENO VÍRUS

O relato da primeira infecção pelo Torque teno virus (TTV) foi em um paciente humano que desenvolveu hepatite pós-transfusão sanguínea, de etiologia desconhecida (NISHIZAWA et al. 1997). Nessa época o vírus foi denominado de TT em homenagem as iniciais do paciente e que por coincidência representa um vírus transmitido por transfusão (TTV = *transfusion transmitted vírus*) e sendo assim o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee of Taxonomy Viruses* – ICTV) propôs que TT significava torque teno, do latim *torques tenuis*, relacionado ao pequeno tamanho e estrutura do seu genoma, similar a um fino colar de contas.

Desde então, um crescente número de vírus que compartilham uma organização do genoma semelhante, mas são extremamente variáveis em suas sequências e tamanhos foram identificados infectando humanos, primatas não humanos, aves domésticas, bovinos, ovinos, cães, gatos, suínos e javalis (LEARY et al., 1999; OKAMOTO et al., 2002; MARTÍNEZ et al., 2006; BRASSARD et al., 2007). A infecção de suínos pelo TTV foi descrita pela primeira vez em 1999, mas somente em 2009 o vírus foi denominado de *Torque teno sus virus* (TTSuV) (ICTV, 2009) (KING et al., 2009).

2.2 CLASSIFICAÇÃO E TAXONOMIA

Inicialmente o TTV ficou caracterizado como um vírus DNA fita simples (ssDNA) circular com estrutura similar a outros vírus que infectam animais e classificados dentro da família *Circoviridae* (MIYATA et al., 1999). Posteriormente, em 2001, o ICTV criou um novo gênero “flutuante” para o TTV, denominado de *Anellovirus* e que não se incluía dentro de nenhuma família viral conhecida. Somente em 2009 quando foi realizada uma análise mais detalhada da estrutura física e molecular da ORF1 (gene que codifica a proteína do capsídeo viral) dos vários protótipos virais descritos, houve a necessidade de que o *International Committee of Taxonomy Viruses* (ICTV 2007) criasse uma nova família, denominada *Anelloviridae*.

A classificação mais recente do *Torque teno sus virus* (TTSuV) pelo ICTV (2011) enquadra o vírus como pertencente à família *Anelloviridae*, gênero *Iotatorquevirus* que compreende as espécies: *Torque teno sus virus 1a* (TTSuV1a) e *Torque teno sus virus 1b* (TTSuV1b); e o gênero *Kapatorquevirus* que até o momento compreende apenas a espécie *Torque teno sus virus k2* (TTSuVk2). Recentemente uma nova espécie dentro do gênero *Kapatorquevirus* foi proposta TTSuVk2b mas ainda não reconhecida pelo ICTV (CORNELISSEN-KEIJERS et al., 2012)

Além do *Torque teno* vírus suíno, a família *Anelloviridae* contém outros nove gêneros de vírus que infectam uma variedade de hospedeiros incluindo humanos e outras espécies de animais domésticos e selvagens, são eles: *Alphatorquevirus* (*Torque teno virus 1-29*), *Betatorquevirus* (*Torque teno mini virus 1-12*), *Deltatorquevirus* (*Torque teno tupaia virus*), *Epsilontorquevirus* (*Torque teno tamarin virus*), *Etatorquevirus* (*Torque teno felis virus, 2*), *Gammatorquevirus* (*Torque teno midi virus 1-15*), *Lambdatorquevirus* (*Torque teno zalophusvirus 1*), *Tetatorquevirus* (*Torque teno canis virus*), *Zethatorquevirus* (*Torque teno douroucoulis virus*) (ICTV, 2011).

O *Torque teno sus virus* (TTSuV) é um vírus não envelopado, esférico medindo de 30-32 nm, com um genoma constituído de DNA fita simples circular, de aproximadamente 2,8 kb (OKAMOTO et al., 2002).

2.3 GENOMA, PROTEÍNAS VIRAIS E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

A descrição do genoma completo do TTV suíno foi realizada em 2002 em uma amostra identificada como Sd-TTV31. O *Torque teno sus virus* (TTSuV) possui o genoma dividido em uma região codificadora que contém três quadros abertos de leitura (ORFs) e outra não codificadora (UTR) que ocupa aproximadamente 24 – 31 % do genoma viral (OKAMOTO et al., 2002).

A região não codificadora do genoma do TTSuV denominada UTR possui 823 nucleotídeos (nt) e apresenta regiões conservadas entre os TTVs que infectam humanos e outras espécies animais (OKAMOTO et al., 2002). Contém uma região rica em CG que formam estruturas em alça (*stem loop*), importantes na regulação da replicação e transcrição e acentuadores (*enhancers*) e promotores (*promoters*) que possuem diferentes atividades transcricionais dependendo da linhagem celular em que o vírus se replica (OKAMOTO et al., 2002; KAMADA et al., 2004; SUZUKI et al., 2004).

Trata-se de uma região conservada, mas sua diversidade molecular é suficiente para diferenciar os gêneros do TTSuV (SEGALÉS et al., 2009). Desta forma, essa região é muito utilizada como alvo para a detecção do TTSuV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou PCR quantitativa (qPCR), em estudos de ocorrência, ou quantificação da carga viral nas populações de suínos (KEKARAINEN; LÓPEZ-SORIA; SEGALÉS, 2007; POZZUTO et al, 2009; SIBILA et al., 2009a; SEGALÉS et al., 2009; HUANG et al., 2010a; NIETO et al., 2011; ARAMOUNI et al., 2011).

A região codificadora do genoma compreende três quadros abertos de leitura denominadas ORF1, ORF2 e ORF3. A ORF1 ocupa 60 % do genoma (1872-1905 nt) e codifica a proteína do capsídeo viral com 635 aminoácidos. Possui em sua estrutura uma região rica em arginina na porção N-terminal relacionada à montagem viral, um domínio *rolling circle replication* (RCR) e potenciais sítios de glicosilação que variam entre os isolados e podem ter efeito na função e ou antigenicidade da proteína (TAKAHASHI; OHTA; MISHIRO, 1998; HIJIKATA et al., 1999).

Assim presume-se que ORF1 seja responsável pela codificação de proteínas estruturais e proteínas associadas à replicação viral (Rep) (MAGGI; BENDINELLI 2009; KAKKOLA et al., 2009). A análise das sequências de nucleotídeos da ORF1 mostrou ser representativa do genoma completo na análise da variabilidade genética dos Anellovirus que infectam animais, servindo, portanto, para classificação genotípica do TTSuV (BIAGINI, 2009; HUANG et al., 2010, CORNELISSEN-KEIJERS et al., 2012).

A variabilidade de aminoácidos também é grande entre os diferentes genótipos, porém não se encontra uniformemente distribuída ao longo da ORF1, ocorrendo com maior frequência nas regiões hipervariáveis (HVRs) que no restante da proteína (JELCIC et al., 2004, MUSHAHWAR et al., 1999; NISHIZAWA et al., 1999). Alguns autores acreditam que o vírus, através de mutações nessas regiões, pode se evadir do sistema imune do hospedeiro, estabelecendo infecção persistente (NISHIZAWA et al., 1999, HUANG et al., 2010).

De acordo com experimentos realizados com a expressão *in vitro* de proteínas do TTSuV utilizando plasmídeos, dois e três splicing alternativos de mRNA e isoformas de proteínas são gerados a partir da ORF1 do TTSuV1 e do TTSuV2 respectivamente, mas a função destas proteínas ainda permanece desconhecida (MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2011).

A ORF-2, com 672 nt é uma região extremamente variável entre os gêneros do TTSuV. A ORF2 codifica uma proteína de 73 aminoácidos que contém um domínio conservado (WX7HX3CX1CX5H), relacionado à proteína tirosina-fosfatase (PTPase) na porção N-terminal. É responsável pela regulação da transcrição dos genes do hospedeiro, transdução de sinais e resposta de citocinas durante a replicação viral (PETERS et al., 2002; PETERS; CRABB; WASHINGTON, 2006). No vírus da anemia das galinhas foi demonstrado que a atividade PTAase pode levar a imunossupressão e anemia em galinhas (PETERS et al., 2002). A expressão da proteína ORF-2 em células humanas bloqueia as vias de NF κ B e, conseqüentemente, a expressão de fatores da inflamação (IL-6, IL-8 e COX-2) impedindo a resposta protetora do hospedeiro a patógenos virais. Desta maneira a ORF-2 pode estar envolvida na regulação da resposta inata e adaptativa do hospedeiro (ZENG et al., 2007; KAKKOLA et al., 2009).

A ORF3 é gerada por um *splicing* alternativo do pré-mRNA (RNA mensageiro) e acredita-se que codifique uma proteína não estrutural de função ainda desconhecida (OKAMOTO et al., 2000; BIAGINI et al., 2001). A ORF1 e ORF3 compartilham os mesmos introns e *splicing* alternativos são usados para codificar diferentes isoformas de proteínas (MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2011). A organização do genoma do TTSuV e *splicing* alternativos da ORF1 e ORF2 estão demonstrados na Figura 1.

O entendimento acerca dos mecanismos biológicos utilizados pelo TTSuV, as vias moleculares específicas na replicação viral e os efeitos da infecção nas células ainda não são muito bem compreendidos, em parte pela falta de um sistema *in vitro* permissivo que suporte sua replicação (KAKKOLA et al., 2009). A análise minuciosa do genoma viral, identificação de regiões reguladoras, genes que codificam proteínas estruturais e caracterização das mesmas é uma ferramenta importante para um melhor entendimento acerca da patogenia, virulência e variabilidade do torqueno vírus suíno.

Os mecanismos pelos quais o TTSuV se liga a receptores celulares e penetra nas células ainda não foi demonstrado. Assim como a maioria dos vírus DNA com pequeno genoma, o TTSuV não codifica uma DNA polimerase e portanto, utiliza a maquinaria celular para sua replicação. Baseado em similaridades com vírus DNA de fita simples (ssDNA) circular acredita-se que o TTSuV use o método de replicação em círculo rolante (RCR) (MUSHAHWAR et al., 1999).

Após a penetração na célula o ssDNA viral é convertido em DNA fita dupla (dsDNA) replicativo intermediário pelas enzimas celulares. A proteína Rep codificada pelo vírus se liga a estrutura *steam loop* onde está localizado o início da replicação e inicia a replicação clivando o DNA e liberando a extremidade 3'-OH. Em seguida a DNA polimerase celular começa a incorporação de nucleotídeos a partir da extremidade livre 3'-OH. A cada novo ciclo de replicação o DNA fita simples é fechado e liberado e poderá ser usado em um novo ciclo de replicação ou encapsidado (MANKERTZ et al., 1998, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do TTSuV indicando os quadros abertos de leitura (ORF) e região não traduzida (UTR)

Fonte: Adaptado de Kekarainen e Segalés (2012).

Legenda: As caixas coloridas indicam o splicing alternativo (linhas pontilhadas) e sequências de aminoácidos resultantes. Cores diferentes indicam diferenças nas sequências de aminoácidos.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Apesar da infecção de suínos pelo TTSuV ter sido descrita pela primeira vez em 1999, amostras datadas de 1985 demonstram que o vírus já circulava na Espanha (SEGALÉS et al, 2009). Desde então, a presença do TTSuV foi relatada em países como os Estados Unidos (EUA), Canadá, Brasil, Espanha, Itália, Alemanha, Japão,

China, Tailândia, Coreia, Hungria, Austrália, Cuba, República Tcheca e Uganda (BIGARRÉ et al., 2005; KEKARAINEN; SIBILA; SEGALÉS, 2006; TAIRA et al., 2009; GALLEI et al., 2010; JARASOVA et al., 2011; WU et al., 2011; DE ARRUDA LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2012; BRINK et al., 2012) com frequências de infecção variáveis, de 17 % a 100 %, em animais de diferentes idades, localização geográfica e granjas com diferentes *status* sanitário, comprovando que se trata de um vírus ubíquo amplamente distribuído nos rebanhos suínos.

A principal forma de transmissão do TTSuV é a horizontal sendo a via fecal-oral a mais importante, mas a forma vertical também se mostrou importante na disseminação do vírus (MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2009, 2010; POZZUTO et al., 2009, SIBILA et al., 2009^a). Ambos os gêneros do TTSuV já foram descritos infectando sêmen, órgãos do aparelho reprodutivo de porcas, colostro e fetos (KEKARAINEN; LÓPEZ-SORIA; SEGALÉS, 2007; MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2009, 2010; POZZUTO et al., 2009; ARAMOUNI et al., 2010; RITTERBUSH et al., 2012). A infecção de fetos suínos foi relatada a partir do segundo terço da gestação (ARAMOUNI et al., 2010; MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2010). Leitões gnotobióticos derivados de cesária apresentaram alta frequência de infecção, sendo detectado o DNA viral no soro e tecidos desses animais. Além disso, foi demonstrado que leitões nascidos negativos de porcas positivas podem se infectar com o vírus logo após a ingestão do colostro (TSHERING; TAKAGI; DEGUCHI, 2012).

A eliminação do TTSuV pelas fezes e secreções nasais foi relatada em leitões a partir de uma semana com o aumento da frequência de infecção acompanhando a idade dos animais (SIBILA et al., 2009^b, DE ARRUDA LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2012). O estudo da dinâmica da infecção pelo TTSuV mostrou que a carga viral aumentou progressivamente até a décima primeira semana de vida, ocorrendo um declínio posteriormente (NIETO et al., 2011), provavelmente relacionado à produção de anticorpos anti-ORF1 como demonstrado por HUANG et al. (2011). Entretanto, a persistência do vírus em animais saudáveis sugere que a resposta de anticorpos neutralizantes não seja eficiente para inativar ou remover completamente as partículas virais infectantes do organismo hospedeiro (HUANG et al., 2011, XIAO et al., 2012). Como mencionado anteriormente, a infecção pelo TTSuV foi constatada em fetos na segunda metade da gestação e, portanto, antes de se tornarem imunocompetentes o que poderia gerar animais imunotolerantes ao vírus (ARAMOUNI et al., 2010)

O TTSuV pode infectar se não todos, a maioria dos órgãos dos suínos, fígado, baço, pulmão, rim, cérebro, coração, medula óssea, linfonodos mesentéricos, linfonodos mediastínicos a partir da quinta semana de vida com uma progressão tanto da frequência quanto da carga viral atingindo seu ápice na terminação (por volta de 24 semanas) (ARAMOUNI et al., 2010). A medula óssea demonstrou ser o maior sítio de replicação e distribuição do vírus para outros tecidos, mas além da medula existem evidências de que a replicação do vírus ocorra em altos níveis no fígado, baço e pulmão (KRAKOWA et al., 2008; ARAMOUNI et al., 2010). Nem todos os órgãos do mesmo animal são infectados e diferentes subtipos podem ser detectados em diferentes órgãos, sugerindo a adaptação de genótipos ou subtipos virais a determinados tipos de células ou tecidos (OKAMOTO et al., 2001; BIGARRE et al., 2005; POZZUTO et al., 2009).

2.5 ASSOCIAÇÃO COM OUTROS AGENTES E DOENÇA

Epidemiologicamente a infecção pelo TTV humano foi associada com doenças hepáticas, distúrbios respiratórios, doenças autoimune, distúrbios hematológicos e câncer, mas não houve correlação entre infecção pelo TTV e o aparecimento de doença clínica específica (BIAGINI et al., 2003; KASIRGA et al., 2005; GERGELY; PERL; POOR, 2006; OKAMOTO et al., 2009). Acredita-se que nem todos os genótipos estão ligados a doenças da mesma maneira e que uns podem ser mais patogênicos que outros. Uma diferença significativa foi encontrada quanto ao número de genótipos amplificados no soro de pacientes infectados com HIV (*humam immunodeficiency virus*) sendo estes infectados com um maior número de genótipos virais em relação aos pacientes HIV negativos (NIEL; DINIZ-MENDES; DEVALLE, 2005).

O TTSuV pode infectar uma proporção relativamente alta de suínos que aparentemente são saudáveis (SIBILA et al., 2009^b). Apesar de não haver descrição da ocorrência de doenças ligadas à infecção pelo TTSuV acredita-se que o vírus pode desencadear o aparecimento dos sinais clínicos na coinfeção com outros agentes, especialmente o Circovírus suíno tipo 2 (PCV2), o vírus da hepatite E (HEV), além do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV), vírus da influenza suína (SIV) e *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo respiratório suíno (PRDC) (ELLIS; ALLAN; KRAKOWKA, 2008; SAVIC et al., 2010; NIETO et al., 2011a, ARAMOUNI et al., 2011, RAMMOHAN et al., 2012).

Recentemente, a infecção pelo TTSuVk2 no pulmão de suínos foi relacionada à presença de lesões pulmonares compatíveis com infecção viral, pneumonia intersticial e bronco-intersticial, na ausência de agentes como PCV2, PRRSV, SIV e o vírus da doença de Aujeszky (ADV) (ARAMOUNI et al., 2013). Ainda, segundo SAVIC e colaboradores (2010), animais que apresentam hepatite subclínica decorrente da infecção concomitante do PCV2 com HEV são mais susceptíveis a infecção pelo TTSuV que os não afetados, o que sugere que o TTSuV possa estar implicado na participação da patogenia nos casos de hepatite em suínos.

Com relação às doenças citadas anteriormente existe um especial interesse pela comunidade científica em associar o TTSuV ao PCV2, possivelmente pelo impacto econômico atribuído a este agente, na indústria suína do mundo todo. É seguramente o agente que causa maior impacto econômico para suinocultura brasileira, tanto pela infecção subclínica quanto pela manifestação clínica de uma série de sintomas que pode culminar com a morte dos animais, apesar disso os dados econômicos sobre a doença no Brasil, são escassos.

Um estudo recente realizado na indústria suína da Inglaterra demonstrou que a perda para cada animal morto em decorrência da infecção pelo PCV2 é de aproximadamente £ 82,00, £ 24,00 para cada animal que se recupera da doença clínica e £ 8,00 para cada animal com infecção subclínica que chega a idade de abate, sendo que a infecção subclínica foi apontada como a principal responsável pelo impacto econômico. O montante gasto estimado na indústria durante a epidemia foi de £ 87 milhões/ano e por volta de £ 52 milhões/ano na fase endêmica, antes da introdução da vacina contra o PCV2 em 2008 (ALARCON et al., 2013).

O circovírus suíno tipo 2 está classificado dentro da família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*. Contém como material genético um DNA fita simples circular protegido por um capsídeo de simetria icosaédrica com 17 nm de diâmetro e é não envelopado (TISHER et al., 1982). A infecção pelo PCV2 promove uma extensiva lesão linfóide, pois o vírus assume a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro alterando o padrão de expressão de citocinas em células do sistema mononuclear fagocitário e nos órgãos linfóides, o que culmina em imunossupressão (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Quando a resposta de anticorpos neutralizantes e a ativação de imunidade celular, incluindo a produção de interferon gama, não são adequadas para promover o clearance viral, o animal desenvolve a doença (BEACH; MENG, 2012).

Além da infecção subclínica (PCV2-SI), uma série de manifestações clínicas está associada à infecção pelo PCV2, como a síndrome do definhamento multissistêmico ou doença sistêmica associada ao PCV2 (PMWS ou PCV2-SD), síndrome dermatite e nefropatia suína (PDNS), falha reprodutiva associada ao PCV2 ou doença reprodutiva (PCV2-RD), doença respiratória associada ao PCV2 ou doença pulmonar (PCV2-LD), enterite associada ao PCV2 ou doença entérica (PCV2-ED), sendo todas estas manifestações incluídas no termo doenças associadas à circovirose suína (PCVAD) (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012). No entanto, considera-se que a infecção pelo PCV2 seja um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença clínica e desta maneira a infecção concomitante com outro agente infeccioso é obrigatória (SEGALÉS, 2012).

A associação do TTSuVk2 com o PCV2 foi primeiramente relatada por pesquisadores na Espanha que observaram uma maior frequência de infecção pelo TTSuVk2 em suínos naturalmente infectados pelo PCV2 e apresentando PMWS, em relação aos saudáveis (KEKARAINEN; SIBILA; SEGALÉS, 2006). Esses achados foram confirmados posteriormente por outros autores (TAIRA et al., 2009; BLOMSTRÖM et al., 2010). Da mesma maneira, foi descrita a associação do TTSuV1 com o aparecimento de sinais clínicos relacionados à doença sistêmica na coinfeção com PCV2 em suínos gnotobióticos inoculados experimentalmente (ELLIS; ALLAN; KRAKOWKA, 2008).

Com a disponibilidade da utilização da PCR quantitativa (qPCR) foi demonstrado que a carga viral do TTSuVk2 no soro de suínos com PMWS tende ser maior em comparação com animais saudáveis (NIETO et al., 2011). Tal fato pode ser explicado pelo maior título de anticorpos neutralizantes (anti-ORF1 IgG) encontrados no soro de animais saudáveis em comparação com animais que apresentam doença clínica relacionada à infecção pelo PCV2 (HUANG et al., 2011).

A coinfeção experimental do TTSuV1 com PRRSV em suínos gnotobióticos desencadeou o aparecimento de um quadro clínico semelhante a PDNS (KRAKOWKA et al., 2008). A maior frequência de infecção pelo TTSuV1 também foi associada com quadros de complexo respiratório suíno (PRDC) nas infecções concomitantes com PRRSV, SIV, *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 (RAMMOHAN et al., 2012).

A carga viral do TTSuV1 encontrada no pulmão de animais PRRSV positivos foi de duas a 5 vezes maior que no pulmão dos animais PRRSV negativos (ZHANG et

al., 2014) e foi demonstrado que a infecção natural pelo TTSuV1 foi capaz de promover a supressão da resposta imunológica na vacinação contra o PRRSV e agravar as lesões pulmonares (ZHANG et al., 2012).

2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA

Em contraste com outros DNA vírus o TTSuV exhibe um alto grau de variabilidade genética e não é incomum que um animal seja infectado por mais de um genótipo (GALLEI et al., 2010; HUANG et al., 2010; PÉREZ et al., 2011; ZHU et al., 2012).

Analisando 121 sequências do genoma completo do TTV humano e de animais, disponíveis no Genbank, pelo método pairwise sequence comparison (PASC), Huang e colaboradores (2010) estabeleceram os seguintes pontos de corte para a classificação do vírus: gênero (36 – 55 %), espécies (55 – 67 %), tipos (67 – 85 %), subtipos (85 – 95 %) e variantes (> 95 %) de identidade de nucleotídeos, sendo propostos três tipos para o TTSuV1 (1a, 1b e 1c) e sete subtipos para o TTSuVk2 (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) (CORTEY et al., 2010; LI et al., 2013). Porém, analisando amostras de TTSuV provenientes da China, LIU e colaboradores (2013) propõem quatro subtipos para cada gênero do TTSuV, TTSuV1 (1a, 1b, 1c e 1d) e TTSuVk2 (2a, 2b, 2c, 2d).

A identidade de nucleotídeos do TTSuV é baixa, por volta de 33 % entre os gêneros e 55% entre as espécies do TTSuV1a e 1b sendo que em nível de aminoácidos essa diferença é ainda maior, em torno de 30 % entre os gêneros e 52 % entre as espécies (HUANG et al., 2010; CORNELISSEN-KEIJERS et al., 2012). A razão e mecanismos pelos quais o TTSuV demonstra essa enorme variabilidade genética ainda não foram completamente elucidados, mas algumas possibilidades são exploradas.

Foi demonstrado que as substituições de nucleotídeos no genoma do TTSuV são comparáveis aos de um vírus RNA ($5,29 - 5,51 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano) (HUANG et al., 2010; CORTEY et al., 2011, CADAR et al., 2013). A elevada taxa de substituições em vírus RNA pode ser explicada pela falta de atividade de correção (*proofreading*) da DNA polimerase – RNA dependente codificada por estes vírus, ao contrário da polimerase celular utilizada pelo TTSuV para sua replicação e portanto, essa alta taxa de mutação não seria esperada.

Contudo acredita-se que a natureza das elevadas taxas de mutação nos vírus de DNA fita simples circular, possa estar relacionada à organização de seu genoma e sistema de replicação que faz com que o genoma viral escape dos mecanismos de reparo celular. Em sua forma replicativa, o DNA dos geminivirus (vírus DNA circular fita simples que infectam plantas) permanece não metilado e como consequência não é afetado pelo sistema de reparo da célula hospedeira (BROUGH et al., 1992). Além disso, como durante o processo de replicação em círculo rolante o vírus permanece DNA fita dupla momentaneamente, o sistema de reparo celular pela excisão de bases é ineficaz (DUFFY; HOLMES, 2008).

As mutações de aminoácidos no TTV estão localizadas principalmente na região intermediária da proteína do capsídeo e em infecções crônicas foi sugerido que o vírus pode ocorrer como quasispecies. Essa estratégia é interessante para o vírus possa evadir o sistema imune estabelecendo infecção persistente (NISHIZAWA et al., 1999).

Além da mutação outro mecanismo responsável pela variabilidade genética é a recombinação que nos vírus DNA fita simples circular acontece com frequência e provavelmente seja conduzido pelos mecanismos de reparo de DNA pela célula hospedeira (MARTIN et al., 2011). Eventos de recombinação natural entre genótipos diferentes e intra e inter-hospedeiros foram descritos para o TTSuV, em suínos domésticos e selvagens, comprovando que a presença de diferentes amostras do TTSuV no hospedeiro suíno e a recombinação podem levar ao aparecimento de novas variantes que contribuem para a diversidade genética e fenotípica do vírus (CADAR et al., 2013).

Os mecanismos pelos quais os vírus evoluem são bastante diversos e complexos. A mutação é um dos principais mecanismos evolutivos, juntamente com a recombinação e rearranjo, no caso dos vírus com genoma segmentado. De acordo com teoria evolutiva de Darwin a seleção natural atua em determinada população maximizando sua aptidão através da proliferação de variantes com mutações favoráveis (seleção positiva) ou pela eliminação de variantes com mutações deletérias (seleção negativa) (ORR, 2009).

A pressão de seleção que ocorre ao nível da proteína pode ser evidenciada pela proporção d_N/d_S , ou seja, proporção de mutações não sinônimas (d_N) (mutação no DNA com alteração do aminoácido) e sinônimas (d_S) (mutação no DNA sem que haja alteração do aminoácido). Quando essa proporção é maior que 1 ($d_N/d_S > 1$) significa que a proporção de fixação de mutações não sinônimas é maior que sinônimas (seleção

positiva), se essa proporção for igual a 1 ($d_N/d_S = 1$) significa que mutações não sinônimas serão fixas na mesma taxa que as sinônimas (seleção neutra) e finalmente quando for menor que 1 ($d_N/d_S < 1$), significa que a taxa de fixação das mutações não sinônimas é menor que das sinônimas (seleção purificadora). Deste modo, mutações que levam a geração de partículas virais defectivas com perda da função das proteínas tendem a ser eliminadas da população.

Do ponto de vista evolutivo, vírus que são extremamente virulentos e acabam por matar seus hospedeiros e conseqüentemente a si mesmo, sugerem ter um menor tempo de evolução e, portanto, estarem menos adaptados ao ambiente. Encontrar um equilíbrio entre replicação e disseminação sem causar a morte prematura do hospedeiro parece ser o principal objetivo de um vírus.

No processo de evolução do TTV acredita-se que sua heterogeneidade genética pode ser explicada por diferentes graus de aptidão genética e falta de competição entre as variantes virais (KHUDYAKOV et al., 2000). Além disso, a natureza das infecções e coinfeções por diferentes variantes do vírus e que possuem habilidade em evadir o sistema imune e estabelecer infecção persistente, podem ser indicativos de um longo processo evolutivo do TTV com os humanos (BENDINELLI et al., 2001).

Tendo em vista que o TTSuV encontra-se amplamente distribuídos nos rebanhos suínos e circula de forma silenciosa potencialmente causando falhas reprodutivas e ainda sendo um dos agentes associados ao desencadeamento dos quadros de PCVAD, é importante que estudos de ocorrência e análise da diversidade genética sejam conduzidos com o propósito de se conhecer mais sobre a epidemiologia viral e potencial patogênico entre os diferentes genótipos, já que os dados no Brasil sobre esse vírus são escassos. Além disso, como se trata de uma família de vírus descoberta recentemente, o sequenciamento de novas amostras provenientes de diferentes regiões pode contribuir sobremaneira para a classificação taxonômica do agente. Como TTSuV infecta uma gama de hospedeiros, estudos em suínos podem servir como modelo de infecção para outras espécies, incluindo o homem.

3 OBJETIVOS

Na literatura compulsada os trabalhos publicados relatando a ocorrência e diversidade genética do TTSuV nos rebanhos de suínos são principalmente provenientes da Europa e EUA. No Brasil até o momento somente quatro artigos foram publicados sobre o assunto sendo que somente um descreve a caracterização de duas sequências completas do genoma viral. Dada a escassez de informação sobre o assunto, este trabalho teve como objetivo:

- Avaliar a ocorrência dos gêneros TTSuV1 e TTSuVk2 em amostras de soro, fezes e tecidos de suínos domésticos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR).
- Comparar as frequências de infecção pelo TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções (TTSuV1 + TTSuVk2, TTSuV1 + PCV2, TTSuVk2 + PCV2, TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) entre animais de diferentes idades (porcas, leitões da creche e crescimento)
- Comparar as frequências de infecção pelo TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções (TTSuV1 + TTSuVk2, TTSuV1 + PCV2, TTSuVk2 + PCV2, TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) entre leitões da creche e crescimento apresentando ou não diarreia
- Comparar as frequências de infecção pelo TTSuV1, TTSuVk2 e e coinfeções (TTSuV1 + TTSuVk2, TTSuV1 + PCV2, TTSuVk2 + PCV2, TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) entre animais da terminação vacinados ou não contra o PCV2
- Comparar as frequências de infecção pelo TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2) entre amostras positivas e negativas para o PCV2.
- Sequenciar a ORF1 do TTSuV1 e TTSuVk2.

- Avaliar a diversidade genética do TTSuV1 e TTSuVk2 circulantes nas populações de suínos domésticos e Porco Monteiro.
- Detectar eventos de recombinação na ORF1 do TTSuV1 e do TTSuVk2.
- Avaliar a pressão de seleção ao longo da ORF1 dos diferentes genótipos do TTSuV1 e do TTSuVk2.
- Detectar regiões importantes imunologicamente ao longo da ORF1

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

As amostras foram processadas e analisadas de acordo com o fluxograma de trabalho apresentado a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma de trabalho

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

4.2 PCR PARA DETECÇÃO DO TTSUV1 E DO TTSUVK2 EM AMOSTRAS DE CAMPO

4.2.1 Amostras

As amostras de campo (soro, tecidos e fezes) selecionadas para o presente estudo estão discriminadas na Tabela 1. Foram coletadas durante o período de 2002-2011 em granjas do Estado de São Paulo e pertencem ao banco de amostras do LABMAS-VPS-USP (Processo FAPESP número 2010/04287-4 e 2007/57115-3). Estas amostras foram previamente utilizadas para estudos de ocorrência e caracterização genética do PCV2 e, portanto, foram classificadas como PCV2 positivas e PCV2 negativas.

Tabela 1 – Relação de amostras utilizadas para detecção do TTSuV1 e TTSuVk2

Amostra	Fases	PCV2 +	PCV2 -	Ano	Total
Soro	Porcas	9	14	2002	23
Fezes	Creche	3	48	2009	51
	Crescimento	18	42	2009	60
Tecidos	Aborto (pool)	3	5	2002/09	8
	Natimorto (pool)	2	23	2002/09	25
	Mumificado (pool)	1	8	2002/09	9
	Pulmão	192	23	2011	215
Total		228	163		391

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Além das amostras de suínos domésticos, foram incluídas no estudo de filogenia um pool de nove (9) amostras de soro de Porco Monteiro do Pantanal (SISBIO 21416-1) coletadas entre 2010 e 2011 e cedidas gentilmente pelo pesquisador Dr. Ubiratan Piovezan (Embrapa, Pantanal).

4.2.2 Extração do DNA

As amostras de fezes foram supendidas em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,4) e amostra de tecidos foram previamente maceradas e suspendidas em TE 20 % p/v. Todas as amostras tiveram do DNA extraído pelo método Proteinase K/fenol:clorofórmio.

Foram adicionados 500 µL de solução de lise (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 100 mM; EDTA 25 mM, pH 8,0; Duodecil Sulfato de Sódio 1 % e 10 µL de Proteinase K a 20 mg/mL) a 100 µL de amostra. A cada cinco amostras foi adicionado um controle negativo da extração correspondente a 100 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase. O material foi homogeneizado e incubado à 56 °C por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio, homogeneizado novamente, e centrifugado a 12.000 xg por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1500 µL contendo 400 µL de propanol.

Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a 4 °C por 12 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 25 minutos a 4 °C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi suspenso em 900 µL de etanol a 70 % e centrifugado, novamente, a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado novamente, por inversão e o sedimento seco em banho-seco (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56° C por 10 minutos. As amostras foram suspendidas em 30 µL de TE e incubadas em banho-seco a 56 °C por 15 minutos. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até a sua utilização.

4.2.3 Controle endógeno da extração

Para eliminar a possibilidade de falso negativo devido à degradação do ácido nucléico ou a presença de inibidores nas amostras, estas foram primeiramente submetidas a uma PCR tendo como alvo o gene da β -actina. O par de iniciadores utilizado na reação foi: AC1 (5' TGA GAC CTT CAA CAC GCC 3') e AC2 (5' ATC TGC TGG AAG GTG GAC 3') para amplificação de um fragmento de aproximadamente 850 pb (HUI et al., 2004). A reação de PCR deu-se sob as seguintes condições: 2,5 µL de DNA extraído foram adicionados a uma reação com volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 X) (Fermentas, EUA), 0,4 µM de cada iniciador e água ultra-pura q.s.p. A PCR foi realizada no

termociclador Peltier Thermal Cycler MJ Research (Bio-Rad, EUA), iniciando-se com o seguinte ciclo: de 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos 94 °C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

4.2.4 Controles da PCR

Uma amostra positiva de cada gênero do TTSuV foi submetida à reação de amplificação pela PCR utilizando os iniciadores descritos por Segalés et al. (2009) (Quadro 1), tendo como alvo a UTR do vírus. As condições da reação foram as mesmas descritas no item 4.2.4. Os fragmentos gerados pela PCR foram purificados diretamente do gel de agarose com o GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Esses fragmentos foram inseridos no vetor pTZ57R/T do kit de clonagem InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific® – EUA), o plasmídeo foi clonado em uma amostra de *Escherichia. coli* denominada JM109 e clones transformados foram selecionados e multiplicados em meio LB (1 % Triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % de cloreto de sódio) contendo 50 µg/mL de ampicilina e 40 µL de IPTG (isopropil 1 β-thiogalactoside – 100 mmol/L) e 40 µL de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside – 50 mg/mL).

Uma PCR utilizando iniciadores M13F e M13R que flanqueiam a região onde o inserto se liga ao vetor foi realizada para confirmação da clonagem. A amplificação dos fragmentos de aproximadamente 465 pb do TTSuV1 e 412 pb do TTSuVk2 foi realizada no termociclador (Peltier Thermal Cycler MJ Research, Bio-Rad, EUA), sob as seguintes condições: 10,0 µL de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 X) (Fermentas, EUA), 0,4 µM de cada iniciador e água ultra-pura q.s.p. O ciclo de amplificação ao qual os fragmentos foram submetidos iniciou-se com 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos à 94 °C por 30 segundos, 58° C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5.

A reação de PCR foi visualizada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Então, o plasmídeo foi extraído das células bacterianas com o emprego do kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

Para a confirmação da especificidade da PCR os plasmídeos foram submetidos à reação de sequenciamento que consistiu 1,0 µL de BigDye (Applied Biosystems®), 2,0 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems®), 0,2 µM de cada iniciador (M13F e M13R) em reações separadas, 30 ng do DNA alvo e água ultra-pura esterilizada q.s.p., para uma reação final de 10 µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®) para 35 ciclos de 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos e 60 °C/4 minutos, com rampa de 1 °C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado com 60 µL de etanol a 100 % e 5 µL de EDTA (125 mM), incubando-se durante 30 minutos, centrifugando-se a 16.000 x g/ 30 minutos a 4 °C, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 60 µL de etanol a 70 %, centrifugando-se a 16.000 x g por 15 minutos a 4 °C e secando-se o precipitado a 95 °C por 5 minutos. Após esta etapa, as sequências foram resolvidas em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

Posteriormente as sequências foram submetidas ao programa computacional PHRED <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>> para análise da qualidade da leitura dos eletroferogramas, sendo aceitas somente as que obtiveram *score* ≥ 20. A sequência final foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>.

Esse plasmídeo foi utilizado como controle positivo em todas as reações e para determinar o limiar de detecção da PCR para o TTSuV1 e o TTSuVk2. O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm (Nanodrop 2000 Spectrophotometer®, Thermo Scientific), sendo realizadas diluições seriadas na base 10. O número de cópias do DNA viral foi definido pela seguinte fórmula:

$$N = \frac{C \times 6 \times 10^{23}}{M}$$

N = número de cópias do DNA viral

C = concentração do plasmídeo medida em espectrofotômetro (260 nm) (g)

6×10^{23} = constante de Avogrado (número de moléculas de DNA em 1 Mol)

M = massa molecular do plasmídeo + vetor em g/M. calculado por:
<<http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html>>

O limiar de detecção da técnica da PCR foi realizado utilizando-se concentrações do plasmídeo de 10^{10} a 10^{-1} como molde da reação. Esse limiar foi considerado correspondente à concentração da maior diluição do plasmídeo que apresentou banda do tamanho esperado no gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL.

4.2.5 Condições da reação

Os primers utilizados para amplificação da UTR de ambos os gêneros do TTSuV (SEGALÉS et al. (2009) estão descritos no Quadro1. Foram realizadas reações separadas para o TTSuV1 e TTSuVk2 sob as seguintes condições: 2,5 µL de DNA extraído foram adicionados a uma reação com volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2 X) (Fermentas, EUA), 0,4 µM de cada iniciador e água ultra-pura q.s.p. A amplificação deu-se no termociclador (Peltier Thermal Cycler MJ Research, Bio-Rad, EUA), iniciando-se com o seguinte ciclo: 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos 94 °C por 30 segundos, 58° C (TTSuV1) e 57° C (TTSuVk2) por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. A visualização dos fragmentos de tamanho esperado foi demonstrada após corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL.

Quadro 1 – Sequência dos pares de iniciadores senso e anti-senso para detecção de TTSuV1 e TTSuVk2

Iniciador	Sequência 5' - 3 (Região de hibridização)	Fragmento
TTV1F	CGGGTTCAGGAGGCTCAAT (9 - 27)	305 pb
TTV1R	GCCATTCGGAAGTGCCTTACT (313 – 292)	
TTV2F	TCATGACAGGGTTCACCGGA (1 - 20)	252 pb
TTV2R	CGTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA (252 - 226)	

Fonte: (SEGALÉS et al., 2009).

Legenda: Localização dos nucleotídeos baseado nas sequências do GenBank AB076001 do TTSuV1 (OKAMOTO et al, 2002) e AY823991 do TTSuVk2 (NIEL; DINIZ-MENDES; DEVALLE, 2005).

As amostras que apresentaram resultado negativo na amplificação do gene da β -actina tiveram o DNA re-extraído e foram re-testadas para amplificação do gene da β -actina e da UTR do TTSuV. Apresentando resultado negativo nas duas reações, a amostra foi excluída da análise.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras tiveram as frequências de infecção determinadas para cada vírus: TTSuV1, TTSuVk2 e para as coinfeções (TTSuV1 + TTSuVk2, TTSuV1 + PCV2, TTSuVk2 + PCV2, TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2).

Entre as amostras de reprodutivo as frequências de infecção e coinfeções foram comparadas entre os grupos: fetos abortados, mumificados e leitões natimortos e ainda se houve aumento da frequência de infecção pelo TTSuV quando o PCV2 esteve presente.

Para as amostras de soro e fezes as frequências de infecção foram comparadas entre as diferentes fases do sistema de criação de suínos (porcas, creche e crescimento), entre animais da creche e crescimento com e sem diarreia e ainda se houve aumento da frequência de infecção pelo TTSuV quando o PCV2 esteve presente.

As amostras de pulmão tiveram as frequências de infecção comparadas entre animais vacinados ou não para o PCV2 e também foi investigado se houve aumento da frequência de infecção pelo TTSuV quando o PCV2 esteve presente.

Em todas as análises foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando o número de amostras foi menor ou igual a 20, $n \leq 20$) para estabelecer possíveis associações entre a infecção pelo TTSuV ou coinfeções, entre os grupos. Na comparação entre grupos o nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DA ORF1 DO TTSUV1 E DO TTSUVK2

A TaKaRa LA Taq[®] (TaKaRa Bio Inc, Japão) é uma DNA polimerase utilizada para amplificação de grandes fragmentos de DNA com atividade de correção

(*proofreading*) 3'-5', ou seja, detecta e corrige a incorporação de bases erradas que causam a elongação lenta do DNA. Essa enzima permite a geração de produtos de PCR com maior fidelidade, pois sua taxa de erro é de $8,7 \times 10^{-6}$.

Cortey e colaboradores (2010) utilizando a enzima, conseguiram amplificar o genoma completo do TTSuV1 e do TTSuVk2 a partir de amostras de soro de suínos, empregando iniciadores direcionados à região conservada do genoma, a UTR. Sendo assim, optou-se por desenhar iniciadores senso direcionados à região 5' UTR e antisenso direcionados à região 3' UTR do TTSuV1 e TTSuVk2, para serem empregados na PCR. A figura 3 representa o genoma do TTSuV em sua forma linearizada, a região não codificadora (UTR) utilizada como alvo para amplificação da região codificadora (ORF1) e respectivos pares de iniciadores.

Figura 3 – Diagrama esquemático da região de hibridização dos pares de iniciadores TTV1F, TTV1R TKR, TTV2F TAK e TTV2R TKR, para amplificação total da ORF1 do TTSuV1 e do TTSuVk2

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Estes iniciadores foram desenhados com base no alinhamento de 35 sequências do TTSuV1 e 47 sequências do TTSuVk2 (APÊNDICES A e B) depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e provenientes de diferentes países.

No quadro 2 estão detalhados os pares de iniciadores usados na amplificação dos fragmentos de 2700 e 2144 pb para o TTSuV1 e TTSuVk2 respectivamente.

Quadro 2 - Sequência dos pares de iniciadores senso e anti-senso utilizados na amplificação de um fragmento de 2700 pb do TTSuV1 e 2144 pb do TTSuVk2

Iniciador	Sequência 5'-3 (Região de hibridização)	Alvo	Referência
TTV1F	CGGGTTCAGGAGGCTCAAT (9 - 27)	5' UTR	Segalés et al., 2009
TTV1R TKR	GCCGGGTAGTTATGTAGCCA (2689 – 2708)	3' UTR	Este trabalho
TTV2F TAK	CTGAGTGTCTAACCGCCTGG (295 - 314)	5' UTR	Este trabalho
TTV2R TKR	CCATGTGTCCTGTGACATTGAGT (2470 – 2492)	3' UTR	Este trabalho

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: Localização dos nucleotídeos baseado nas Sequências do GenBank (AB) do TTSuV1 e (AY823991) do TTSuVk2.

Em um primeiro experimento para amplificação do TTSuV1 e TTSuVk2 foram testados DNA extraídos de amostras de pulmão sem diluição e diluídos 1:10 em água ultrapura livre de DNase e RNase. A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 5 µL de DNA da amostra numa reação final de 50 µL contendo 5 µL de 10X LA PCR Buffer II, 5 µL de MgCl₂ (concentração final de 2,5 mM), 8 µL de dNTP (concentração final de 2,5 mM cada), 0,5 µM de cada iniciador senso e antiseno, 0,5 µL (2,5 unidades) de TaKaRa LA Taq[®] (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) e água ultrapura qsp 50 µL. As condições de reação foram realizadas de acordo com o protocolo de Cortey e colaboradores (2010) sendo: 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos 95 °C por 30 segundos, 48° C (TTSuV1) ou 55° C (TTSuVk2) por 30 segundos, 72 °C por 3 minutos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos em termociclador T3000 48 (Biometra GmbH, Göttingen, Alemanha).

Posteriormente, para ambas as reações TTSuV1 e TTSuVk2 foram realizados gradiente de temperatura em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf[®]) tendo como alvo o DNA de amostra de pulmão diluído 1:10 e amostra de soro sem diluição. A reação de PCR teve sete diferentes temperaturas de hibridização (49,6° C, 50,7° C, 52° C, 53,4° C, 54,8° C, 56,1° C, 57,1° C) e foi escolhida a temperatura da reação que apresentou banda específica mais robusta e menor quantidade de produto inespecífico, pela visualização dos fragmentos em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e revelados em luz UV.

Os fragmentos amplificados foram cortados do gel de agarose e purificados com kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

4.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ORF1 DO TTSUV1 E DO TTSUVK2

Para a clonagem e sequenciamento da ORF1 do TTSuV foram utilizadas 21 amostras de pulmão de suínos domésticos e um pool de 9 amostras de soro de Porco Monteiro do Pantanal (SISBIO 21416-1) cedidas gentilmente pelo pesquisador Dr. Ubiratan Piovezan (Embrapa, Pantanal). O produto de PCR foi inserido no vetor pTZ57R/T do kit de clonagem InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e como descrito no item 4.3.

Para o sequenciamento dos fragmentos de 2700 pb do TTSuV1 e 2144 pb do TTSuVk2 além dos iniciadores senso (TTV1F e TTV2F TAK) utilizados na amplificação, foram desenhados outros 5 iniciadores senso para o TTSuV1, e 4 para o TTSuVk2, totalizando 6 iniciadores para sequenciar o TTSuV1 e 5 para sequenciar o TTSuVk2. O desenho dos iniciadores foi baseado no alinhamento das 35 sequências do TTSuV1 e 47 sequências do TTSuVk2 depositadas no Genbank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>, citadas no item 4.4 (APÊNDICES A e B). Como o genoma de ambos os gêneros do TTSuV possui regiões muito variáveis, optou-se pelo emprego de iniciadores degenerados. Além disso, os iniciadores TTSuV1C e TTSuV1D para o TTSuV1 e TTSuVk2C e TTSuVk2D para o TTSuVk2 foram desenhados em regiões próximas do genoma com o intuito de aumentar a sensibilidade do sequenciamento. No Quadro 3 estão detalhados os iniciadores usados no sequenciamento dos fragmentos do TTSuV1 e TTSuVk2 respectivamente.

Quadro 3 – Sequência dos iniciadores senso utilizados no sequenciamento do TTSuV1 e do TTSuVk2

Iniciadores	Sequência 5'-3'	Região de hibridização	Alvo	Gênero
TTV1F	CGGGTTCAGGAGGCTCAAT	9 – 27	5' UTR	
TTSuV1A	TCTWCCGWAGAGGDGGACG	727 – 745	ORF1	
TTSuV1B	ACNACDCAGTGGCARTTYC	1287 - 1306	ORF1	
TTSuVCn	TACANVTGGAAANVVBGAGA	1645-1664	ORF1	TTSuV1
TTSuV1C	TTGGHAAACTNVRACDCCAA	1969 - 1989	ORF1	
TTSuV1D	VCNCATGACDTAGACTTYGG	1995 - 2014	ORF1/ORF3	
TTSuV1E	ATYACGAGTGCCGAAAGCT	2406 - 2424	ORF1/ORF3	
TTV2F TAK	CTGAGTGTCTAACCGCCTGG	295 - 314	5' UTR	
TTSuVk2A	ACAGACGCTATCGCAGAC	542 - 559	ORF1/ORF2/ ORF3	
TTSuVk2B	CDCAATGGGAGACTDAGHAG	1138 - 1157	ORF1	TTSuVk2
TTSuVk2C	SARGGNTGGCCHTAYTGG	1469 - 1486	ORF1	
TTSuVk2D	TAGGNRTNRTAGGATGGGC	1592 - 1610	ORF1	

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: Localização dos nucleotídeos baseado nas sequências do GenBank (AB076001) do TTSuV1 e (AY823991) do TTSuVk2 respectivamente. As letras em negrito simbolizam as bases degeneradas: W = A, T; N = A, T, G, C; D = G, A, T; R = A, G; Y = C, T; V = G, A, C; H = A, T, C; S = G, C.

A reação de sequenciamento foi realizada após a quantificação de cada plasmídeo sendo que o volume final da reação (10 µL, 15 µL ou 20 µL) foi adaptado à concentração do plasmídeo. Para uma reação de volume final de 10 µL foram adicionados entre 400 – 600 ng do DNA alvo, 1 µL de BigDye v.3.1 (Applied BiosystemsTM), 2,0 µL de 5x Sequencing buffer (Applied BiosystemsTM) e 0,5 µL de cada iniciador a 10 pmol. As condições de amplificação assim como a precipitação do produto seqüenciado foram realizadas como descrito no item 3.1

As sequências geradas foram submetidas ao programa computacional PHRED <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>> para análise da qualidade da leitura dos eletroferogramas, sendo aceitas somente as que obtiveram *score* ≥ 20. A sequência final foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação da especificidade do fragmento em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>.

4.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Sequências completas da ORF1 do TTSuV1 e do TTSuVk2 foram alinhadas pelo método Clustal W utilizando o programa Bioedit v.7.2.5 (HALL, 1999), juntamente com sequências homólogas depositadas no Genbank. A construção dos dendrogramas foi realizada pelo programa Mega v.6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando-se o método de inferência filogenética neighbor-joining, o modelo de substituição de nucleotídeos p-distance e testando-se a confiabilidade dos ramos pelo método *bootstrap* com valores de 1000 repetições.

A identidade de nucleotídeos entre as sequências alinhadas foi calculada pelo programa Bioedit v.7.2.5 (HALL, 1999). A diversidade média dentro de cada tipo ou subtipo e a distância média entre diferentes tipos ou subtipos foram calculadas utilizando o programa Mega v.6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.7 DETECÇÃO DE POTENCIAIS EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO

Com o objetivo de identificar possíveis eventos de recombinação entre as amostras de TTSuV foram utilizados o programa GARD (*Genetic Algorithms for Recombination Detection*) (KOSAKOVSKY POND et al., 2006) disponível no pacote HyPhy do servidor Datamonkey <<http://www.datamonkey.org>> além de mais 6 algoritmos alocados no pacote RDP4 (*Recombination Detection Program*) (MARTIN et al, 2010), RDP, GENECONV, MaxChi, Chimera, Bootscan e 3Seq, utilizando o limiar de detecção padrão.

O GARD utiliza um algoritmo genético de seleção baseado em máxima verossimilhança para pesquisar em alinhamentos de múltiplas sequências pontos de interrupção (*breakpoints*) no genoma e identificar possíveis sequências recombinantes.

O RDP4 é um programa que permite a identificação e caracterização estatística de eventos de recombinação históricos a partir de um determinado conjunto de sequências alinhadas. Utiliza métodos de detecção de recombinação não paramétricos (RDP, GENECONV, MaxChi, Chimera, Bootscan, 3Seq) para identificar pontos de interrupção no genoma onde se inicia e termina a recombinação além das sequências parentais doadoras do fragmento recombinante. Para os possíveis eventos de recombinação foram consideradas recombinantes as amostras que apresentaram o

evento de recombinação na mesma região do alinhamento detectada pelo GARD e em pelo menos cinco dos seis algoritmos do pacote RDP4 sendo considerados valores de $p < 0,05$.

4.8 ANÁLISE DA PRESSÃO DE SELEÇÃO

O programa RDP4 permite salvar o alinhamento sem os pontos de recombinação ou sequências recombinantes que posteriormente foi usado para análise de pressão de seleção. A pressão de seleção foi avaliada para cada sítio de aminoácido individualmente pela taxa (d_N/d_S) número de substituições não sinônimas e sinônimas para toda a ORF1 de cada tipo e subtipo do TTSuV usando SLAC (Single Likelihood Ancestor Count), FEL (Fixed Effects Likelihood), REL (Random Effects Likelihood), MEME (Mixed Effects Model of Evolution) e FUBAR (Fast Unbiased Bayesian AppRoximation) (KOSAKOVSKY POND; FROST, 2005). Os métodos SLAC, FEL e REL detectam sítios de aminoácidos sob seleção pelo algoritmo de máxima verossimilhança. Já o MEME considera que a distribuição de ω ($\omega = d_N/d_S$) pode variar de sítio para sítio e também de ramo para ramo da árvore em um mesmo sítio, sendo capaz de identificar tanto seleção positiva pervasiva quanto episódica e finalmente o FUBAR que pode detectar seleção positiva sob um modelo mais rápido do que os modelos de efeito fixo de máxima verossimilhança através da introdução de um teste rápido de Monte Carlo e cadeia Markov (MCMC) que permite visualizar inferência bayesiana para cada local. Os sítios foram considerados sob seleção quando $p < 0,1$ para os modelos SLAC, FEL e MEME, *Bayes factor* > 50 para o modelo REL e uma probabilidade posterior $> 0,90$ para FUBAR.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS MOTIVOS DE AMINOÁCIDOS DA ORF1 E PROPRIEDADES DA PROTEÍNA

Após o alinhamento das sequências, foram calculadas as identidades de aminoácidos da ORF1 para cada tipo do TTSuV1 e subtipo do TTSuVk2. Os motivos conservados RCR foram identificados utilizando manualmente e as regiões hipervariáveis gerando-se o gráfico de entropia. A entropia refere-se à complexidade na

composição de aminoácidos para cada posição do alinhamento considerando o número e frequências de diferentes aminoácidos observados em cada posição. A média de hidrofobicidade também foi computada para o grupo do TTSuV1 e do TTSuVk2 (PARKER; GUO; HODGES, 1986), utilizando-se o programa Bioedit v.7.2.5 (HALL, T.A. 1999). Além disso, também foram avaliadas seguintes propriedades da proteína: acessibilidade (EMINI et al., 1985), antigenicidade (KOLASKAR; TONGAONKAR 1990) e presença de epítomos lineares (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006) utilizando-se o programa Antibody Epitope Prediction disponível online em: <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input>.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DO TTSUV1 E TTSUVK2 EM AMOSTRAS DE CAMPO, COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As reações de PCR utilizadas para detecção do TTSuV1 e do TTSuVk2 apresentaram limiar de detecção de 25 e 37 partículas virais respectivamente.

A Tabela 2 mostra as frequências de infecção para o TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções (TTSuV + PCV2) em amostras de fetos abortados e mumificados e leitões natimortos.

Tabela 2 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de tecidos de fetos abortados e mumificados e leitões natimortos

Amostra	Vírus, número e porcentagem (%) de amostras positivas					
	TTSuV1	TTSuVk2	TTSuV1+ TTSuVk2	TTSuV1+ PCV2	TTSuVk2+ PCV2	TTSuV1+ TTSuVk2 +PCV2
Aborto (n = 8)	0	2 (25)	1 (13)	0	3 (38)	0
Natimorto (n = 25)	0	4 (16)	3 (12)	1 (4)	1 (4)	0
Mumificado (n = 9)	0	0	0	0	0	0
Total (n = 42)	0	6 (14)	4 (10)	1 (2)	4 (10)	0

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

A maior frequência de infecção foi observada para TTSuVk2 tanto em fetos abortados (25 %) quanto em leitões natimortos (16 %) seguida pela coinfeção

TTSuV1+TTSuVk2 (13 % e 12 %) respectivamente. A infecção somente pelo TTSuV1 não foi detectada nas amostras e nenhuma amostra de feto mumificado foi positiva para o TTSuV. Não houve diferença estatística significativa entre as frequências de infecção pelo TTSuV1 ($p = 0,810$), pelo TTSuVk2 ($p = 0,452$), nem para coinfecção TTSuV1 + TTSuVk2 ($p = 0,970$) entre fetos abortados e leitões natimortos.

A associação TTSuV2 + PCV2 foi observada com maior frequência nos fetos abortados (38 %) do que em leitões natimortos (4 %) sendo encontrada diferença estatística significativa ($p = 0,012$). A frequência de infecção pelo TTSuVk2 foi maior nos PCV2 positivos (38 %) que nos PCV2 negativos (25 %), porém essa relação não foi estatisticamente significativa ($p = 0,418$).

Figura 4 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções em amostras de fetos suínos abortados, mumificados e leitões natimortos provenientes de granjas do Estado de São Paulo.

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolo: * representa diferença estatística significativa entre os grupos comparados ($p < 0,05$).

A Tabela 3 mostra as frequências de infecção para o TTSuV1, TTSuVk2 e coinfecções (TTSuV + PCV2) em amostras de soro e fezes de suínos de diferentes fases da criação: porcas, leitões da creche e crescimento.

Tabela 3 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de soro de porcas e fezes de leitões em fase de creche e crescimento

Fases	Vírus, número e porcentagem (%) de amostras positivas					
	TTSuV1	TTSuVk2	TTSuV1+ TTSuVk2	TTSuV1+ PCV2	TTSuVk2+ PCV2	TTSuV1+ TTSuVk2 +PCV2
Porcas (n = 23)	5 (22)	1 (4)	8 (35)	3 (13)	1 (4)	3 (13)
Creche (n = 69)	20 (29)	4 (6)	3 (4)	2 (3)	1 (1)	3 (4)
Crescimento (n = 42)	2 (5)	7 (17)	7 (17)	0	3 (7)	10 (24)
Total (n = 134)	27 (20)	12 (9)	18 (13)	5 (4)	5 (4)	16 (12)

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

De maneira geral os animais foram mais frequentemente infectados pelo TTSuV1 (20 %) seguido pela coinfeção TTSuV1 + TTSuVk2 (13 %) e TTSuVk2 (9 %).

O TTSuV1 foi mais frequente infectando leitões da creche (29 %) e porcas (22 %) enquanto que o TTSuV2 foi mais frequente infectando leitões do crescimento (17 %). Diferenças estatísticas significativas foram encontradas entre porcas e leitões do crescimento e entre leitões da creche e crescimento na frequência de infecção pelo TTSuV1 ($p = 0,000$ para ambos), porém estas diferenças não foram observadas para o TTSuVk2 ($p > 0,05$). A coinfeção pelo TTSuV (TTSuV1 + TTSuVk2) foi mais frequente nas porcas (35 %) que em leitões da creche (4 %) e crescimento (17 %), sendo encontrada diferença estatística significativa entre porcas e leitões da creche ($p = 0,000$) e porcas e leitões do crescimento ($p = 0,013$).

A coinfeção TTSuV1 + PCV2 foi mais frequente nas porcas (13 %) enquanto que TTSuVk2 + PCV2 foi mais frequente em leitões do crescimento (7 %) mas não houve diferença estatística significativa entre as três fases ($p > 0,05$). Com relação à coinfeção pelos três agentes (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) foi encontrada diferença estatística significativa somente entre leitões da creche e crescimento ($p = 0,002$).

Não foi observado aumento da frequência de infecção pelo TTSuV nos animais PCV2 positivos em comparação com os PCV2 negativos, exceto pela coinfeção TTSuV1 + TTSuVk2 na fase de crescimento que foi de 17 % nos PCV2 negativos passando a 24 % nos PCV2 positivos, porém não houve diferença estatística significativa ($p = 0,176$) (Figura 5).

Figura 5 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções em amostras de fezes de leitões em fase de creche e crescimento e soro de porcas provenientes de granjas do Estado de São Paulo

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolos: * + • ■ ◇ representam diferença estatística significativa entre os grupos comparados ($p < 0,05$).

A Tabela 4 mostra as frequências de eliminação do TTSuV1, TTSuVk2 e associações (TTSuV + PCV2) em amostras de fezes de leitões com e sem diarreia.

Tabela 4 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de fezes de leitões com e sem diarreia

Vírus, número e porcentagem (%) de amostras positivas						
Sinal clínico	TTSuV1	TTSuVk2	TTSuV1+ TTSuVk2	TTSuV1+ PCV2	TTSuVk2+ PCV2	TTSuV1+ TTSuVk2 +PCV2
Com diarreia (n = 36)	6 (17)	5 (14)	3 (8)	0	1 (3)	9 (25)
Sem diarreia (n = 75)	16 (21)	6 (8)	7 (9)	2 (3)	4 (5)	4 (5)
Total (n = 111)	22 (20)	11 (10)	10 (9)	2 (2)	5 (5)	13 (12)

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

As frequências de eliminação para o TTSuVk2 e para os três vírus (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) foram maiores nos animais com diarreia (14 % e 25 %) em

comparação com os animais sem diarreia (8 % e 5 %), sendo observada diferença estatística significativa somente nas frequências de eliminação dos três vírus (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) ($p = 0,017$).

Não foi observado aumento da frequência de infecção pelo TTSuV nos animais PCV2 positivos em comparação com os PCV2 negativos, exceto pela coinfeção TTSuV1 + TTSuVk2 nos animais apresentando diarreia que foi de 8 % nos PCV2 negativos passando a 25 % nos PCV2 positivos, com diferença estatística significativa ($p = 0,023$) (Figura 6).

Figura 6 – Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções em amostras de fezes de leitões com e sem diarreia provenientes de granjas do Estado de São Paulo

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolos: * + representam diferença estatística significativa entre os grupos comparados ($p < 0,05$).

A Tabela 5 mostra as frequências de infecção para o TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções (TTSuV + PCV2) em amostras de pulmão de suínos vacinados e não vacinados contra o PCV2.

Tabela 5 – Detecção do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções pela PCR em amostras de pulmão de animais vacinados e não vacinados contra o PCV2

Categoria	Vírus, número e porcentagem (%) de amostras positivas					
	TTSuV1	TTSuVk2	TTSuV1+ TTSuVk2	TTSuV1+ PCV2	TTSuVk2+ PCV2	TTSuV1+ TTSuVk2 +PCV2
Vacinados (n = 50)	3 (6)	3 (6)	8 (16)	5 (10)	5 (10)	25 (50)
Não vacinados (n = 165)	0	2 (1)	7 (4)	26 (16)	9 (5)	120 (73)
Total (n = 215)	3 (1)	5 (2)	15 (7)	31 (14)	14 (7)	145 (67)

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

A frequência de infecção pelo PCV2 mostrou ser menor nos animais vacinados (72 %) que nos não vacinados (95 %), com significância estatística $p < 0,05$. Foram encontradas frequências de infecção bem altas para os três agentes (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) tanto em amostras de animais vacinados (50 %) ou não (73 %) contra o PCV2. Foi observado aumento da frequência de infecção pelo TTSuV1 + PCV2 e pelo TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2 nos animais não vacinados (16 % e 76 %) em relação aos vacinados (10 % e 50 %), com diferença estatística significativa para a coinfeção com os três agentes ($p = 0,013$).

Houve aumento da frequência de infecção pelo TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2) nos animais PCV2 positivos em comparação com os PCV2 negativos tanto nos animais vacinados como nos não vacinados contra o PCV2, sendo encontrada diferença estatística significativa na infecção pelo TTSuV1 nos animais não vacinados ($p = 0,039$) e na coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2) nas duas categorias vacinados ($p = 0,018$) e não vacinados ($p = 0,003$) (Figura 7).

Figura 7 - Frequência do TTSuV1, TTSuVk2 e coinfeções em amostras de pulmão de animais vacinados e não vacinados para o PCV2, provenientes de granjas do Estado de São Paulo

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolos: * + • ◊ representam diferença estatística significativa entre os grupos comparados ($p < 0,05$).

5.2 AMPLIFICAÇÃO DA ORF1, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

Do total de 193 amostras de pulmão positivas para o TTSuV1, 28 tiveram o fragmento de 2700 pb amplificado, 16 foram clonadas mas somente 12 tiveram clones sequenciados em sua totalidade, resultando em 32 sequências. Das 177 amostras positivas para o TTSuVk2, 24 tiveram o fragmento de 2144 pb amplificados, 15 foram clonadas mas somente 12 tiveram clones sequenciados em sua totalidade, resultando em 25 sequências. Foram geradas, portanto, 57 sequências da ORF1 do TTSuV de suínos domésticos.

As amostras de soro de Porco Monteiro encontravam-se previamente diluídas em tampão TE (Tris-EDTA) e por essa razão na amplificação houve uma baixa concentração de amplicon. Sendo assim optou-se pela extração do DNA de um pool de

nove amostras sendo 9 positivas para o TTSuV1 e 3 positivas para o TTSuVk2. Quando clonadas, foram geradas 5 sequências para o TTSuV1 e 3 para o TTSuVk2, totalizando 8 sequências da ORF1 de Porco Monteiro.

5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Cinquenta e sete clones foram sequenciados no total, sendo 32 do TTSuV1 e 25 do TTSuVk2. O alinhamento de nucleotídeos da região que codifica a ORF1 das 57 sequências juntamente com quatro amostras de referência do Genbank, AB076001 (*Iotatorquevirus* espécie 1a), AY823990 (*Iotatorquevirus* 1b), AY823991 (*Kappatorquevirus* espécie 2a) e JQ406844 (*Kappatorquevirus* espécies proposta 2b) evidenciou que as amostras do presente estudos pertencem a duas espécies distintas do gênero *Iotatorquevirus* (1a e 1b) enquanto que as sequências do gênero *Kappatorquevirus* se agruparam em um único cluster referente à espécie 2a (Figura 8). A identidade de nucleotídeos entre os dois gêneros do vírus variou de 30,4 – 36,2 %, enquanto que entre as espécies 1a e 1b a identidade foi de 53,8 – 56,8 % e entre as espécies 2a e 2b foi de 52,2 – 54,1 %. Os resultados dos cálculos das identidades, mínima e máxima, entre as gêneros e espécies encontram-se descritos na tabela 6.

Figura 8 - Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuV1 e do TTSuVk2 construída pelo método neighborjoining, tendo p-distance como modelo de substituição e 1000 repetições de bootstrap

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: A árvore mostra a relação filogenética entre 32 sequências do TTSuV1 e 25 sequências do TTSuVk2 do presente estudo. Amostras de referência do Genbank para cada espécie estão destacadas em vermelho.

Tabela 6 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1905 nt) de 32 sequências do TTSuV1, 25 sequências do TTSuVk2 do presente estudo e 4 amostras de referência (AB076001 = 1a; AY823990 = 1b; AY823991 = 2a; JQ406844 = 2b) disponíveis no Genbank

Gênero/espécie	(%)
<i>Iotatorquevirus/Kappatorquevirus</i>	30,4 – 36,2
<i>Iotatorquevirus</i> 1a	64,7 – 99,0
<i>Iotatorquevirus</i> 1b	63,9 – 99,6
<i>Iotatorquevirus</i> 1a/1b	53,8 – 56,8
<i>Kappatorquevirus</i> 2a	64,6 – 99,3
<i>Kappatorquevirus</i> 2b	95,9 – 99,0
<i>Kappatorquevirus</i> 2a/2b	52,2 – 54,1

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

De acordo com a classificação proposta para o TTSuV (HUANG et al., 2010), o alinhamento de nucleotídeos da ORF1 das 32 sequências do presente estudo e 39 sequências do TTSuV1 provenientes do Genbank mostrou a segregação em quatro grupos correspondendo a tipos virais distintos: 1a, 1b, 1c, 1d, sendo que a sequência TTSuV1 PMC22 foi a única representante do tipo 1d (Figura 9). Na análise do dendrograma nota-se que a sequência AM66 C6 ficou separada dos outros dois grandes grupos que compõem o tipo 1a. A média de identidade de nucleotídeos desta amostra com as outras sequências do tipo 1a foi maior (67,9 %) do que com os outros tipos, 1b (59,0 %), 1c (60,2 %) e 1d (65,3 %), o que permitiu classificá-la como pertencendo ao tipo 1a. Não foi encontrada relação entre a segregação das amostras e localização geográfica.

Quando submetidas ao Blastn as sequências AM66 C6, AM66 C1 e PM C22 apresentaram resultados interessantes. AM66 C6 obteve cobertura de 75,0 % e identidade de 83,0 % com HM633256 tipo 1a sendo que essa menor cobertura pode ser explicada por um fragmento de 527 nucleotídeos (posição no alinhamento, 864 – 1390) que não apresentou identidade com nenhuma amostra. AM66C1 obteve 98,0 % de cobertura e 82,0 % de identidade com a amostra HM633256 tipo 1a. Esta mesma sequência teve um fragmento de 496 nucleotídeos (1 – 495) com identidade de 90% com a sequência HM623225 representante do tipo 1c. PM C22 obteve cobertura de 63,0 % com identidade de 77,0 % com GU456384 tipo 1b sendo que um fragmento de 485 nucleotídeos (888 – 1372) não obteve identidade amostras do Genbank (APÊNDICE C). Além disso PM C22 obteve 89,0 % de identidade com um fragmento de 246

nucleotídeos (1 – 245) e 80,0 % de identidade com um fragmento de 544 nucleotídeos (1370 – 1923) da amostra JX173482 tipo 1a. Os resultados dos cálculos das identidades mínima e máxima de nucleotídeos entre as sequências das espécies 1a, 1b, 1c e 1d encontram-se descritos na tabela 7.

Dentro de cada tipo, o 1a foi o que apresentou maior diversidade genética e o 1c a menor. A diversidade média dentro de cada tipo viral foi de 21,0 % para 1a, 16,0 % para 1b e 11,0 % para 1c. A distância média entre a sequência TTSuV1 PMC22 pertencente ao tipo 1d com relação aos outros tipos foi: 1d/1a = 35,0 %, 1d/1b = 33,0 % e 1d/1c = 31,0 %.

Figura 9 – Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuV1 construída pelo método neighborjoining, tendo p-distance como modelo de substituição e 1000 repetições de bootstrap. A árvore mostra a relação filogenética entre 32 sequências do TTSuV1 do presente estudo e 39 amostras disponíveis no Genbank

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolos: ▼ representam amostras de suínos domésticos; ■ representam amostras de porco monteiro, cores iguais representam sequências da mesma amostra. Amostras de referência do Genbank estão destacadas em vermelho.

Tabela 7 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1908 - 1950 nt) de 32 sequências do TTSuV1 provenientes de 12 amostras do presente estudo e 39 amostras disponíveis no Genbank.

Tipo	1a	1b	1c	1d
1a	65,7 – 99,3 %	59,9 – 58,6 %	55,4 – 61,0 %	60,0 – 64,2 %
1b	53,6 – 60,3 %	79,9 – 98,5 %	64,7 – 67,3 %	64,9 – 67,5 %
1c	56,1 – 63,9 %	63,7 – 67,7 %	80,7 – 93,7 %	66,3 – 66,6 %

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

O alinhamento de nucleotídeos da ORF1 das 25 sequências do presente estudo e 47 amostras do TTSuVk2 provenientes do Genbank mostrou a segregação em sete grupos correspondendo a subtipos virais diferentes: 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f e 2g, sendo que a sequência TTSuVk2 AM93 C3 foi a única representante do subtipo 2d e as sequências TTSuVk2 PMC3, PMC10 e PMC15 identificadas no presente trabalho, formaram o grupo do subtipo 2g (Figura 10). Quando submetidas ao Blastn a sequência AM93 C3 apresentou 100,0 % de cobertura e 82,0 % de identidade com a amostra HM633236 pertencente ao subtipo 2c e PM C15 apresentou 97,0 % de cobertura com 83,0 % de identidade com a amostra HM623237 classificada como subtipo 2f.

Dentre as amostras do subtipo 2a, duas destacam-se formando um cluster separado, AM65 C2 e AM146 C3. A identidade média de nucleotídeos da sequência AM146 C3 com relação à 2a foi de 85,4 % e da amostra AM65 C2 foi de 83,7 %, sendo as maiores em relação aos outros subtipos. Com relação aos outros subtipos AM146 C3 teve média de identidade de nucleotídeos com 2b (81,4 %), 2c (73,7 %), 2d (73,8 %), 2e (66,9 %), 2f (67,3 %), 2g (66,4 %) e AM65 C2 teve média de identidade de nucleotídeos com 2b (83,5 %), 2c (75,3 %), 2d (74,3 %), 2e (68,0 %), 2f (68,0 %), 2g (67,3 %). A identidade entre ambas foi de 86,9 % agrupando-as, portanto, dentro do conjunto de amostras do subtipo 2a.

Os resultados dos cálculos das identidades mínima e máxima entre as sequências das espécies 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f e 2g encontram-se descritos na tabela 8.

A maior diversidade encontrada dentro dos grupos foi para o 2a, 2e e 2f. A diversidade média dentro de cada subtipo viral foi de 11,0 % para 2a, 10,0 % para 2b, 7,0 % para 2c, 11,0 % para 2e e 2f, e 1,0 % para 2g. A distância média entre a sequência TTSuVk2 AM93 C3 pertencente ao subtipo viral 2d com relação aos outros subtipos foi: 2d/2a = 25,0 %, 2d/2b = 25,0 %, 2d/2c = 18,0 %, 2d/2e = 29,0 %, 2d/2f = 29,0 %, 2d/2g = 1,0 %.

$2d/2g = 31,0 \%$. Já o grupo de três sequências, TTSuVk2 PMC3, PMC10 e PMC15 representantes do subtipo 2g apresentaram as seguintes distâncias médias com os outros grupos: $2g/2a = 30,0 \%$, $2g/2b = 31,0 \%$, $2g/2c = 31,0 \%$, $2g/2d = 31,0 \%$, $2g/2e = 22,0 \%$, $2g/2f = 19,0 \%$.

Figura 10 – Árvore filogenética de nucleotídeos da ORF1 do TTSuVk2 construída pelo método neighborjoining, tendo p-distance como modelo de substituição e 1000 repetições de bootstrap. A árvore mostra a relação filogenética entre 25 sequências do TTSuVk2 do presente estudo e 47 amostras disponíveis no Genbank

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: símbolos: ▼ representam amostras de suínos domésticos; ■ representam amostras de porco monteiro, cores iguais representam sequências da mesma amostra. Amostras de referência do Genbank estão destacadas em vermelho.

Tabela 8 – Identidade mínima e máxima de nucleotídeos do alinhamento da ORF1 (1863 - 1896 nt) de 25 sequências do TTSuVk2 provenientes de 13 amostras do presente estudo e 47 amostras disponíveis no Genbank.

Subtipo	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g
2a	83,0 –	79,4 –	73,8 –	72,5 –	66,5 –	66,1 –	65,7 –
	99,6 %	84,3 %	76,1 %	74,6 %	68,9 %	68,3 %	67,8 %
2b	79,2 –	86,0 –	73,6 –	73,2 –	66,5 –	65,8 –	66,0 –
	84,6 %	93,6 %	75,5 %	75,0 %	68,6 %	67,6 %	67,6 %
2c	71,7 –	72,7 –	91,3 –	79,8 –	69,0 –	71,3 –	66,5 –
	75,4 %	74,9 %	92,4 %	80,5 %	70,0 %	71,7 %	66,9 %
2e	66,1 –	66,2 –	70,3 –	68,5 –	85,2 –	80,8 –	77,1 –
	69,0 %	69,8 %	70,9 %	69,5 %	98,1 %	83,0 %	80,4 %
2f	66,2 –	67,6 –	70,1 –	67,8 –	79,4 –	85,8 –	81,1 –
	69,2 %	69,2 %	71,7 %	69,0 %	80,9 %	86,6 %	82,1 %

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Dentre as amostras testadas, AM64, AM66, AM201, AM14, AM65 e AM67 mostraram-se coinfectadas por mais de um tipo ou subtipo do TTSuV, além disso AM14, AM65 e AM67 mostraram-se coinfectadas por ambos os gêneros do TTSuV.

As amostras e respectivos tipos e subtipos virais sequenciados estão apresentados no quadro 4.

Quadro 4 – Amostras de pulmão e soro que tiveram a ORF1 do TTSuV sequenciada e os respectivos genótipos encontrados

Amostra/genótipo	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	Total
AM1	+											1
AM14		+			+				+			3
AM55		+++										3
AM64					++	+						3
AM65	+		+		++							4
AM66	++		++									4
AM67	++++	++				++						8
AM68							+					1
AM69		++++										4
AM70					+							1
AM71			+									1
AM85	++											2
AM93								+				1
AM129		++										2
AM136	+											1
AM146									+			1
AM148					+							1
AM161										+		1
AM190					+							1
AM201		++	++									4
AM205					++							2
PM				+	++++						+++	8
Total	11	14	6	1	14	3	1	1	2	1	3	57

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: os sinais de + indicam a quantidade de sequências obtidas de cada genótipo.

5.4 DETECÇÃO DE POTENCIAIS EVENTOS DE RECOMBINAÇÃO

A análise de possíveis eventos de recombinação revelou três eventos para o ambos os gêneros do TTSuV em pelo menos cinco dos sete algoritmos testados no programa RDP4 além do GARD. Cinco das 32 sequências do TTSuV1 e seis das 25 do TTSuVk2 foram apontadas como recombinantes, sendo que estes eventos ocorreram mais frequentemente tanto na região amino como na região carboxi-terminal da proteína do capsídeo de ambos os gêneros do TTSuV. No quadro 5 estão apresentados todos os eventos de recombinação detectados para as sequências do TTSuV1 e do TTSuVk2, as possíveis sequências doadoras de fragmentos e a região do alinhamento onde estes eventos ocorreram.

Os eventos de recombinação do TTSuV1 ocorreram entre sequências do mesmo tipo, 1b com 1b mas também entre sequências de tipos diferentes, 1a com 1c e 1d com 1a. A sequência AM66 C1 que segregou das demais no grupo do tipo 1a e PM C22 tipo 1d foram detectadas como recombinantes, porém o mesmo não ocorreu para a amostra AM66 C6. AM66 C1 apresentou um fragmento recombinante de 394 nucleotídeos na região 5' tendo como sequência doadora AM66 C4 tipo 1c. Do mesmo modo, PM C22 tipo 1d detectada como recombinante teve como sequência doadora AM136 C2 tipo 1a e sequência relacionada AM55 C1 tipo 1b.

Na figura 11 estão apresentados os resultados do evento de recombinação da amostra PM C22. As setas pretas indicam no gráfico, a identidade de nucleotídeos entre a sequência recombinante (Rec), sequência doadora (Doa) e sequência relacionada (Rel). Sequência doadora ou *minor parent* é suposta sequência que doou o fragmento recombinante e sequência relacionada ou *major parent* é a sequência que aparentemente contribui com a maior identidade do restante da sequência. As setas vermelhas indicam a região do alinhamento onde ocorreu a recombinação. A figura 12 representa o dendrograma baseado na matriz de distância da sequência recombinante PM C22.

Para o grupo do TTSuVk2, os eventos de recombinação ocorreram entre amostras do mesmo subtipo 2a com 2a e entre subtipos diferentes, 2g com 2c e 2b com 2a. A sequência AM67 C2 subtipo 2b detectada como recombinante teve como sequência doadora AM14 C1 subtipo 2a e sequência relacionada AM55 C1 tipo 1b. As sequências AM93 C3 subtipo 2d, AM65 C2 e AM 146 C3 subtipo 2a que apresentam-se segregadas no dendrograma não foram identificadas como recombinantes. Por outro lado, PM C3, PM C10 e PM C15 que formaram o grupo do subtipo 2g tiveram um fragmento de 156 nucleotídeos da região 5' detectado como recombinante. Neste caso a sequência doadora do fragmento não foi identificada, mas o programa atribui uma provável sequência AM68 C1 (2c) evidenciando que seja desconhecida (D).

Quadro 5 – Eventos de recombinação detectados em amostras de suíno doméstico e porco monteiro, utilizando seis algoritmos implementados pelo programa RDP4

Recombinante	Eventos	Métodos	Genótipos	Sequência doadora/relacionada	faixa de valor de p	Fragmento recombinante/ Região do alinhamento
TTSuV1 AM66 C1	1	6	1a	AM66 C4(1c)/AM67 C10	$1,73 \times 10^{-17} - 3,33 \times 10^{-41}$	19 - 412
TTSuV1 AM55 C1	2	6	1b	AM69 C7 (1b)/AM129 C1	$6,54 \times 10^{-3} - 1,40 \times 10^{-7}$	1674 - 16
TTSuV1 AM201 C5	2	6	1b	AM69 C7 (1b)/AM129 C1	$6,54 \times 10^{-3} - 1,40 \times 10^{-7}$	1661 - 16
TTSuV1 AM129 C1	2	6	1b	AM69 C7 (1b)/AM129 C1	$6,54 \times 10^{-3} - 1,40 \times 10^{-7}$	1636 -21
TTSuV1 PM C22	3	6	1d	AM136 C2 (1a)/AM55 C1	$1,63 \times 10^{-5} - 3,39 \times 10^{-22}$	1714-208
TTSuVk2 AM65 C4	1	6	2a	AM190 C4 (2a)/PM C13 (D)	$1,92 \times 10^{-3} - 2,13 \times 10^{-6}$	165 - 494
TTSuVk2 AM70 C2	1	6	2a	AM190 C4 (2a)/PM C13 (D)	$1,92 \times 10^{-3} - 2,13 \times 10^{-6}$	165 - 494
TTSuVk2 PM C3	2	5	2g	(D) AM68 C1 (2c)/AM161 C5	$1,95 \times 10^{-3} - 6,71 \times 10^{-11}$	5 - 160
TTSuVk2 PM C10	2	5	2g	(D) AM68 C1 (2c)/AM161 C5	$1,95 \times 10^{-3} - 6,71 \times 10^{-11}$	5 - 160
TTSuVk2 PM C15	2	5	2g	(D) AM68 C1 (2c)/AM161 C5	$1,95 \times 10^{-3} - 6,71 \times 10^{-11}$	5 - 160
TTSuV1 AM67 C2	3	5	2b	AM14 C1 (2a)/AM65 C2	$7,45 \times 10^{-3} - 1,96 \times 10^{-6}$	1683 - 3

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: foram considerados valores de $p < 0,05$.

Figura 11 – Resultado do evento de recombinação detectado para a sequência TTSuV1 PM C22 pelo programa RDP4 após pesquisa pelos algoritmos RDP, Geneconv, Bootscan, MaxChi, Chimera e 3Seq

Figura 12 – Dendrograma baseado no método de distância para a região do alinhamento sem o fragmento recombinante (A) e com o fragmento recombinante (B) da sequência do TTSuV1 PM C22

5.5 ANÁLISE DA PRESSÃO DE SELEÇÃO

Na análise da pressão de seleção estimada pela taxa d_N/d_S ao longo da ORF1 para cada genótipo do TTSuV foram identificados sítios selecionados positivamente para o TTSuV1a, TTSuV1b, TTSuVk2a, TTSuVk2b e TTSuVk2c, em pelo menos três dos cinco algoritmos testados. A d_N/d_S média para cada genótipo foi de: 0,35 (1a), 0,23 (1b), 0,38 (1c), 0,27 (2a), 0,34 (2b), 0,80 (2c), 0,38 (2e), 0,23 (2f) e 0,97 (2g) (Quadro 6).

Quanto à localização dos códons identificados sob pressão positiva, parece que a região hipervariável entre os resíduos 297 – 414 e a região carboxi-terminal 513 – 619 foram as mais afetadas pela seleção. Por outro lado entre os genótipos 1a e 1b foram identificados códons sob seleção positiva na região amino-terminal nas posições 107 (1a), 3, 4 e 64 (1b). A ORF1 e ORF2 do TTSuV se sobrepõem em aproximadamente 50 aminoácidos na região amino-terminal, por isso códons identificados com mutações não sinônimas podem ser na realidade mutações sinônimas em um passo de leitura diferente. É importante destacar que alguns sítios foram identificados como sujeitos à pressão pervasiva e episódica simultaneamente e que estes sítios encontram-se principalmente na região hipervariável da ORF1, 107 e 315 (1a), 3 e 64 (1b), 369 e 387 (2a) e 414 (2b).

Quadro 6 – Análise da pressão de seleção e respectivas posições dos códons da ORF1 onde foi identificada pressão positiva

Continua

	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g
SLAC	628	3	ND		570	ND	297	NA	ND	ND	ND
FEL	58, 107**, 315**, 409, 446, 504, 513, 537, 539, 606, 628	3**, 4**, 64**, 511, 515**, 531, 550**, 578	642	NA	38, 363, 369**, 387**, 502, 532*, 614, 617**, 619**	295, 366**, 414**	498, 501, 507**, 513**	NA	513	ND	ND
REL	38, 43, 57	3**, 4**, 64**, 515**, 550**	ND	NA	502, 507, 514, 532, 541, 617**, 619**	557, 563, 589, 618	297**, 371, 390, 421, 429, 434, 435, 450, 463, 477, 481, 489, 491, 498, 507**, 508, 513**, 517, 522, 525, 549, 567, 577, 612, 613	NA	ND	47, 192, 269, 279, 293, 328, 339, 358, 366, 457, 460	ND
MEME	8, 28, 38, 39, 40, 54, 57, 58, 107**, 158, 178, 184, 254, 307, 315**, 336, 361, 382, 409, 425, 427, 428, 445, 446, 504, 513, 525, 539, 565, 570,	3**, 4**, 6, 64**, 67, 106, 112, 119, 134, 171, 196, 228, 299, 301, 327, 333, 384, 388, 395, 401, 415, 421, 431, 440, 441, 449, 483, 515**, 528, 545, 550**, 560, 574, 575, 578, 581, 582,	18, 50, 63, 114, 122, 446, 501, 535, 538, 609, 642	NA	38, 245, 289, 297, 358, 363, 369**, 371, 372, 386, 387**, 436, 450, 511, 565, 566, 569, 573, 576, 580, 581, 584, 587, 588, 589, 592, 593,	3, 25, 123, 130, 185, 278, 289, 290, 294, 296, 366**, 370, 400, 414**, 612	297**, 371, 389, 421, 434, 507**, 508, 513**, 549, 616	NA	279,280, 326, 339, 342, 365, 366, 513	256,332, 358, 399, 400, 460	ND

Continuação

	584, 620, 634	586, 610, 615, 616, 633			600, 604, 607, 609, 614, 617**, 619**, 626						
FUBAR	107**, 315**	3**, 64**	ND	NA	289, 369**, 387**	366**, 400, 414**	ND	NA	364, 365	ND	ND
d _N /d _S	0,35	0,23	0,38	NA	0,27	0,34	0,8	NA	0,38	0,23	0,97

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Legenda: Foram consideradas significantes as análises pelo FEL, SLAC, MEME os resultados com $p < 0,01$, 50 Bayes factor para REL e probabilidade posterior $\geq 0,9$ para o FUBAR. ND = não detectado, NA = não aplicável, símbolos ** = códons detectados sob pressão positiva em pelo menos três métodos.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MOTIVOS DE AMINOÁCIDOS DA ORF1 E PROPRIEDADES DA PROTEÍNA

A identidade de aminoácidos entre os dois gêneros do TTSuV não foi superior aos 21,0 % (15,4 – 20,9 %). Entre as espécies do *Iotatorquevirus* (1a/1b) variou de 47,6 – 53,8 % e entre as espécies do *Kappatorquevirus* (2a/2b) de 39,8 – 43,6. A variação dentro da espécie 1a foi de 60,7 - 98,7 %, 59,8 - 99,2 % dentro da 1b, 55,7 - 98,4 % dentro da 2a e 97,7 % dentro da 2b. As identidades de aminoácidos se apresentaram mais baixas que as de nucleotídeos, o que é incomum, e não foram encontradas regiões conservadas entre os dois gêneros do vírus. Apesar disso, as sequências AM66 C1, AM67 C10 e AM136 C2 tiveram maior identidade de aminoácidos que nucleotídeos com as amostras GU570201, GU570202, HM633243, HM633245, HM633251, HM633256, JX173482, AM1 C5 e AM 67 C2.

O tamanho da ORF1 entre os tipos do TTSuV1 variou de 636 a 650 aminoácidos (1908 – 1950 nucleotídeos) onde foram encontradas 23 regiões conservadas com ao menos três resíduos. Os tipos 1a e 1b obtiveram a menor identidade entre os grupos 47,1 % e 1c e 1d a maior 63,7 %. As identidades de aminoácidos encontradas entre os tipo dos TTSuV1 estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Identidade mínima e máxima de amoniácidos do alinhamento da ORF1 (636 - 650 aa) de 32 sequências do TTSuV1 provenientes de 12 amostras do presente estudo e 39 amostras disponíveis no Genbank.

Tipo	1a	1b	1c	1d
1a	60,4 – 99,6 %	47,2 – 52,7 %	50,2 – 54,9 %	55,4 – 59,7 %
1b	47,1 – 54,0 %	81,4 – 98,9 %	59,6 – 62,0 %	60,7 – 62,4 %
1c	49,3 – 59,3 %	60,0 – 63,2 %	82,4 – 96,7 %	63,2 – 63,7 %

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

A região amino-terminal da ORF1 apresentou alto número de resíduos de arginina e dois motivos RCR (III) conhecidos YxxK e YPVR foram identificados. YxxK foi localizado em três posições diferentes do alinhamento tendo como referência a sequência AB076001, posição 14 – 17 nas sequências do tipo 1a e 1d; posição 166 – 169 sequências AM66 C6 (1a) e tipo 1b exceto AM14 C4 e AM69 C7; posição 379 – 382 sequências AM66 C6 (1a), tipo 1b, 1c e 1d. YPVR foi identificado em apenas uma posição do alinhamento 520 – 523 em sequências do tipo 1a exceto AM66 C1 e AM67

C4. A sequência PM C22 apresentou um códon de parada precoce localizado na posição do aminoácido 142.

Ao longo das sequências da ORF1 foram identificadas regiões com alta taxa de substituições de aminoácidos, denominadas de regiões hipervariáveis (HVRs). Essas regiões puderam ser mais facilmente visualizadas pelos gráficos de entropia gerados para cada genótipo do TTSuV (APÊNDICE D). De maneira geral a região de maior complexidade de aminoácidos se concentra entre as posições 300 e 450 do alinhamento sendo que o grupo do TTSuV 1a mostrou ser o mais heterogêneo com regiões variáveis ao longo de toda a ORF1. Analisando separadamente os grupos duas outras regiões hipervariáveis foram encontradas na ORF1 do 1b e 1c, entre as posições 100 - 115 e 575 - 590.

No perfil de hidrofiliçidade média gerado entre as sequências do TTSuV1, a região entre os resíduos de aminoácidos 620 - 630 apresentou maior score (APÊNDICE D). Essa região é altamente conservada entre os tipos do TTSuV1 com maior frequência de resíduos de serina. Nessa região também foram identificadas outras características da proteína relacionadas à ligação com anticorpos como acessibilidade e presença de epítomos lineares (Tabela 11). É importante salientar que na sequência do tipo 1d a região com maior probabilidade de localização de epítomos lineares foi na posição 109 próxima ao códon de parada precoce encontrado na posição 140 indicando que uma proteína menor possa ser expressa. A região amino-terminal rica em resíduos de arginina também apresentou epítomos de maior acessibilidade (posições 9, 12, 14 e 17) e as regiões de maior antigenicidade foram localizadas na região hipervariável da ORF1 entre as posições 326 - 338.

A ORF1 entre os diferentes subtipos do TTSuV2 variou de 621 a 632 aminoácidos (1863 - 1896 nucleotídeos) onde foram identificadas 42 regiões conservadas contendo ao menos três resíduos de aminoácidos. A maior identidade foi encontrada entre os subtipos 2a e 2b (86,3 %) e a menor entre 2c e 2g (57,6 %). As identidades de aminoácidos apresentaram-se menores que as de nucleotídeos, exceto para as sequências AM65 C2 e AM146 C3 que tiveram maiores identidades de aminoácidos que nucleotídeos com todas as sequências do subtipo 2a do Genbank usadas no presente trabalho e as sequências PM C10 e PM C15 que tiveram maiores identidades de aminoácidos com as sequências HM633214, HM633229 e AM14 C1 (subtipos 2e) e HM633237, HM633235 e HM633223 (subtipos 2f). As identidades de

aminoácidos encontradas entre os subtipos dos TTSuVk2 estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 – Identidade mínima e máxima de aminoácidos do alinhamento da ORF1 (621 - 632 aa) de 25 sequências do TTSuVk2 provenientes de 13 amostras do presente estudo e 47 amostras disponíveis no Genbank

Subtipo	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g
	81,1 –	78,0 –	69,0 –	70,3 –	62,8 –	61,0 –	58,8 –
2a	99,5 %	84,8 %	73,2 %	73,4 %	65,3 %	63,2 %	62,4 %
	76,9 –	86,2 –	70,6 –	69,3 –	62,7 –	61,4 –	59,5 –
2b	86,3 %	95,2 %	71,6 %	71,5 %	64,4 %	62,4 %	63,1 %
	67,8 –	68,8 –	90,6 –	78,6 –	62,2 –	63,0 –	57,6 –
2c	71,4 %	72,4 %	90,9 %	78,9 %	63,0 %	63,7 %	60,3 %
	59,3 –	58,8 –	62,8 –	61,9 –	83,3 –	78,7 –	75,9 –
2e	64,9 %	63,5 %	64,4 %	62,7 %	97,5 %	79,8 %	80,4 %
	59,3 –	60,7 –	64,1 –	62,7 –	78,3 –	84,8 –	79,1 –
2f	64,9 %	64,1 %	64,6 %	63,0 %	80,5 %	85,3 %	83,5 %

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

Assim como ocorre com o TTSuV1, a região amino terminal do TTSuVk2 contém alto número de resíduos de arginina e dois motivos RCR III (YxxK e YPVR) e um motivo RCR II (HxQ) foram encontrados. YxxK apareceu em quatro posições diferentes do alinhamento tendo como referência a amostra AY823991, posição 105 – 108 em todos os subtipos exceto AM68 C1 subtipo 2c e AM93 C3 subtipo 2d, posição 242 – 245 nas sequências do subtipo 2g, posição 360 – 363 sequência AM68 C1 e posição 481 – 485 encontrada em todos os subtipos exceto AM146 C2 subtipo 2e e AM146 C3 subtipo 2a. HxQ foi identificado em duas posições do alinhamento, posição 604 – 606 em sequências do subtipo 2c e 2d e posição 614 – 616 nos subtipos 2a, 2b, 2c e 2d com exceção de AM67 C5 subtipo 2b.

A região hipervariável ao longo da ORF1 observada pelo gráfico de entropia ocorreu entre os resíduos 250 – 420, mas outras regiões com alta variabilidade foram encontradas, entre os resíduos 1-5 no subtipo 2g, 460 – 480 e 510 – 520 nos subtipos 2e e 2f e 610 no subtipo 2c (APÊNDICE E).

A hidrofiliabilidade média entre as sequências do grupo do TTSuVk2 teve maior score entre as posições 590 – 600, região com alta concentração de resíduos de serina e altamente conservada entre os subtipos 2a, 2b, 2c e 2d e entre 2e, 2f e 2g.

A região amino-terminal contendo os resíduos de arginina, foi identificada como a de maior acessibilidade entre as posições 9 – 46 e a predição de epítomos

lineares ocorreu tanto na região hipervariável entre os resíduos 297 – 416 como na região carboxi-terminal entre 507 e 596. Com exceção do subtipo 2g os epítomos de maior antigenicidade foram identificados dentro na região hipervariável nas posições 273 – 275. Nas sequências do subtipo 2g a região de maior antigenicidade foi detectada na posição 421, como são apenas três sequências nesse grupo não se pode afirmar que essa região esteja fora da região hipervariável. A identidade de aminoácidos foi alta entre as sequências do subtipo 2g, 93, 8 % a 97,7 % mas uma região entre os resíduos de aminoácidos 305 - 330 teve divergência de 96 % entre PM C3 e PM C10.

Tabela 11 – Características da proteína relacionadas exposição de epítomos na superfície

Características	Posição dos aminoácidos no alinhamento										
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g
Acessibilidade	9, 14, 617, 619, 621, 629	17, 612	615, 618, 620	12	44, 45	44	46	9	9	46	38
Antigenicidade	70, 326, 328, 368 417, 619,	164, 327, 344, 612	337, 338, 340	338	273, 274	273, 274	275	274	275	275	421
Epítopo linear	520,521, 598, 600, 605, 607, 610, 619	602, 603	603, 606, 608	109	368, 297, 416, 588, 596	404, 410	299	368	510, 573	507	507

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

6 DISCUSSÃO

A presença do torque teno vírus suíno foi relatada em órgãos do sistema reprodutor masculino e feminino bem como em sêmen, colostro e tecidos fetais (RITTERBUSH et al., 2012; KEKARAINEN; LÓPEZ-SORIA; SEGALÉS, 2007; MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2009, 2010; POZZUTO et al., 2009; ARAMOUNI et al., 2010; TSHERING; TAKAGI; DEGUCHI, 2012). A frequência de eliminação pelo sêmen mostrou ser bastante alta para ambos os gêneros, 55 % para o TTSuV1 e 32 % para o TTSuVk2 acompanhando a viremia dos animais, o que demonstra que esta é uma importante via na transmissão do vírus para as fêmeas (KEKARAINEN; LÓPEZ-SORIA; SEGALÉS, 2007).

A investigação de amostras de suínos de ambos os sexos provenientes do centro de pesquisa da Embrapa suínos e aves, Brasil, revelou que o TTSuVk2 também foi mais frequente infectando tanto órgãos do aparelho reprodutor feminino (30,1 % para o TTSuV1 e 49,3 % para o TTSuVk2) quanto órgãos do aparelho reprodutor masculino (10 % para o TTSuV1 e 96,6 % para o TTSuVk2) mas a infecção pelo TTSuV não foi associada a problemas reprodutivos (RITTERBUSH et al., 2012).

No presente estudo realizado com 42 amostras de produto de abortamento e leitões natimortos oriundos de porcas com problemas reprodutivos, foram encontradas frequências de infecção para o TTSuVk2 de 25 % e 16 % em fetos abortados e leitões natimortos respectivamente enquanto que a infecção pelo TTSuV1 sozinho não foi detectada em nenhuma amostra (Tabela 2). A frequência de infecção encontrada para o TTSuVk2 em nossas amostras de fetos abortados (25 %) e leitões natimortos (16 %) revelou ser semelhante à relatada na Espanha (29,6 % e 7 %) respectivamente (MARTÍNEZ-GUINÓ et al., 2010, 2009).

A análise da frequência de infecção de tecidos fetais em dois momentos diferentes da gestação, demonstrou frequências de 80 % para o TTSuV1 e TTSuVk2 em fetos no segundo terço de gestação e 40 % e 100 % para o TTSuV1 e TTSuVk2 respectivamente, no terço final de gestação (ARAMOUNI et al., 2010). Em conjunto, esses resultados demonstram que o TTSuVk2 é mais frequente infectando tanto órgãos do trato reprodutivo de animais adultos quanto tecidos fetais e leitões natimortos o que pode ser explicado pelo fato de que o TTSuVk2 tenha um maior tropismo por estes tecidos e ainda que o vírus seja mais eficiente em atravessar a barreira transplacentária. Essa suspeita fica mais evidente pelos resultados apresentados por Tshering e

colaboradores, (2012) que constataram haver maior frequência de infecção pelo TTSuVk2 (100 %) que pelo TTSuVk1 (25 %) em leitões recém paridos de porcas positivas privados de ingerir o colostro.

A alta frequência de infecção pelo TTSuVk2 também foi associada a maior frequência de leitões natimortos e a um maior número médio de leitões natimortos paridos por porca em relação as porcas infectadas pelo TTSuV1, e esses achados foram ainda mais evidentes na coinfecção (TTSuV1 + TTSuVk2) (SIBILA et al, 2009a).

De fato, se o TTSuVk2 participa na patogenia de problemas reprodutivos em porcas ainda não se pode afirmar, uma vez que as amostras coletadas para este estudo são provenientes de animais com problemas reprodutivos e neste caso um comparativo com um grupo controle (que não apresenta problemas reprodutivos) não pode ser feito. Além disso, parece que infecção de fetos suínos *in útero* é um evento frequente em porcas multíparas sendo relatado para ambos os gêneros do TTSuV (POZZUTO et al., 2009, SIBILA et al, 2009^a).

Constantemente o aumento da frequência de infecção pelo TTSuV tem sido associado à coinfecção pelo PCV2 nos quadros de doença clínica. Houve uma aumento da frequência de infecção pelo TTSuV2 mas amostras PCV2 positivas (38 %) contra 27 % das PCV2 negativas mas se esse resultado está relacionado a infecção clínica ou subclínica nas porcas não se pode afirmar já que o histórico clínico dos animais não foi acessado. Por outro lado, é comprovado que o PCV2 pode se replicar em tecidos fetais e eventualmente causar a interrupção da gestação (MALDONADO et al., 2005) o que explicaria essa maior frequência da coinfecção TTSuVk2 + PCV2 encontrada em fetos abortados (38 %) em comparação com leitões natimortos (4 %) (Figura 4).

Cento e onze amostras de fezes de leitões e vinte e três soros de porcas provenientes de cinco propriedades do Estado de São Paulo foram testados. O TTSuV esteve presente em todas as propriedades investigadas com diferentes frequências de infecção pelos dois vírus, dependendo da idade dos animais, sendo que as porcas e leitões da creche apresentaram maior frequência de infecção pelo TTSuV1 (22 % e 29 %) e o TTSuVk2 foi mais frequente infectando leitões do crescimento (17 %). A coinfecção (TTSuV1 + TTSuVk2) também foi mais frequente nas porcas (35 %) (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos, parece que à medida que os animais ficam mais velhos existe um aumento na frequência da infecção para ambos os gêneros do TTSuV (Figura 4).

Diferentes frequências de infecção pelo vírus foram relatadas em rebanhos suínos provenientes de países como Espanha, Alemanha, República Tcheca, China, Uganda e Estados Unidos e essas diferenças foram atribuídas principalmente à localização geográfica das propriedades, diferenças no sistema de produção e idade dos animais (SIBILA et al., 2009^b, ARAMOUNI et al., 2010; GALLEI et al., 2010; JAROSOVA; POGRANICHNIY; CELER, 2011; WU et al., 2011; BRINK et al., 2012; XIAO et. al., 2012).

Na República Tcheca maiores frequências de infecção pelo TTSuVk2 que pelo TTSuV1 foram encontradas em leitões desmamados (60,6 % e 52,7 %) e porcas (87,5 % e 75 %) (JAROSOVA; POGRANICHNIY; CELER, 2011). Já em propriedades dos EUA a frequência de infecção para o TTSuV1 foi maior do que para o TTSuVk2 em animais da creche (30 % e 6,7 %), da terminação (81 % e 67 %) e em suínos maduros com mais de 25 semanas (79,6 % e 22,2 %) (XIAO et. al., 2012). O TTSuV1 também foi mais frequente que o TTSuVk2 em propriedades da Espanha tanto em porcas (54 % e 32 %) quanto em leitões de 1 a 15 semanas (76 % e 60 %) sendo que o número de animais infectados aumentou com a idade e a maior frequência encontrada para o TTSuV1 (76 %) foi maior em animais com 11 semanas e para o TTSuVk2 (65 %) com 15 semanas (SIBILA et al., 2009^b).

Wu e colaboradores (2011) investigaram propriedades de suínos de diferentes raças na China e demonstraram haver altas frequências de infecção para ambos os gêneros do TTSuV. As maiores frequências para o TTSuV1 foram encontradas em animais desmamados (93,3 %) e para o TTSuVk2 em adultos (100 %) e não houve diferença de frequências de infecção entre raças ou sexo. No Brasil, os relatos sobre a circulação do vírus nas granjas são escassos, apenas um trabalho realizado em granjas do sul, sudeste e centro-oeste demonstrou que a frequência de infecção para TTSuV1 (48 %) foi maior que para o TTSuVk2 (17 %) em amostras de fezes de suínos lactentes (DE ARRUDA LEME; ALFIERI; ALFIERI, 2012).

A viremia nas porcas e a alta frequência de infecção pelo TTSuV1 em leitões da creche demonstram que provavelmente a transmissão vertical via colostro tem papel fundamental na disseminação do vírus, o que foi comprovado pelo experimento de Tshering, Takagi e Deguchi (2012) que encontraram um aumento da frequência de infecção pelo TTSuV1 de 25 % antes da ingestão do colostro para 75 % 24 horas após a ingestão do colostro. Contudo, o aumento da frequência das coinfeções (TTSuV1+

TTSuVk2 e TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) em leitões do crescimento em comparação à creche, pode ser indicativo de que esses vírus sejam favorecidos pela transmissão horizontal.

Com animais sendo infectados tão precocemente, não seria esperada uma frequência tão alta de porcas virêmicas, já que uma resposta de anticorpos neutralizantes eficiente resulta no clearance viral. Assim como ocorre em humanos, a infecção pelo TTSuV pode levar a uma longa viremia que dura por vários anos (BENDINELLI et al., 2001). A persistência do vírus em suínos saudáveis indica que a resposta de anticorpos neutralizantes não seja eficiente para inativar ou remover as partículas virais infectantes do organismo hospedeiro (HUANG et al., 2011, XIAO et al., 2012) ou ainda que constantemente ocorra a reinfecção por novos genótipos sem que haja imunidade cruzada (HUANG et al., 2012).

Como foi observado que muitos animais da creche e crescimento apresentavam diarreia, a relação entre infecção pelo TTSuV e diarreia foi investigada. Uma maior eliminação do TTSuV1 foi observada tanto em animais diarreicos (17 %) quanto nos não diarreicos (21 %) em comparação com o TTSuVk2 (14 % e 8 %) (Figura 6). Foi constatado que a eliminação do TTSuV pelas fezes é baixa, menos de 20% em *swabs* retais de suínos da Espanha entre 1 a 15 semanas de idade (SIBILA et al, 2009b), porém os resultados apresentados por De Arruda Leme, Alfieri, Alfieri, (2012) em propriedades do Brasil demonstram que essa eliminação pode ser maior chegando a 41 % e 48 % para o TTSuV1 em animais desmamados e lactentes respectivamente.

Em humanos, a eliminação do vírus nas fezes ocorre principalmente via secreção biliar no intestino delgado, contendo hepatócitos infectados pelo vírus (OKAMOTO et al., 1998), mas em macacos Rhesus experimentalmente infectados com TTV foi demonstrado que o vírus também é capaz de se replicar no intestino delgado (XIAO et al., 2002). O DNA viral de ambos os gêneros do TTSuV foi encontrado em linfonodos mesentéricos mas vale destacar que o TTSuVk2 foi encontrado com maior frequência que o TTSuV1 (70 % e 50 %) respectivamente a partir da quinta semana de vida em linfonodos mesentéricos de suínos naturalmente infectados (ARAMOUNI et al., 2010; NIETO et al., 2013).

Apesar de evidências de que o epitélio intestinal seja um sítio de replicação do vírus não se pode deixar de considerar a importância da infecção de outros agentes causadores de diarreias em leitões, e neste caso, a infecção pelo PCV2 merece destaque.

A coinfecção com os três agentes (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) foi significativamente maior em animais diarreicos (25 %) do que nos não diarreicos (5 %), além disso no grupo dos diarreicos a coinfecção por ambos os vírus foi maior nos PCV2 positivos (25 %) em relação aos PCV2 negativos (8 %). Como as amostras foram coletadas em granjas que não praticavam a vacinação é provável que alguns animais estivessem manifestando a doença clínica entérica ou mesmo sistêmica associada ao PCV2, já que animais com doença sistêmica podem apresentar diarreia mas com base no diagnóstico clínico destas duas formas de apresentação não é possível diferenciar (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

Nos quadros de doença clínica, o PCV2 causa depleção linfóide e linfopenia, culminando em imunossupressão e permitindo a infecção de coagentes como, por exemplo, o parvovírus suíno, rotavírus suíno, coronavírus suíno, *Escherichia coli* (MENG, 2012; ZHANG et al., 2012), e neste contexto o aumento da frequência de eliminação do TTSuV se daria por dois motivos. O primeiro seria uma maior taxa de replicação do TTSuV em consequência da imunossupressão e o segundo é que devido a inflamação causada no intestino ocorra uma maior descamação do epitélio, resultando em maior eliminação de células infectadas pelo vírus.

De qualquer maneira, pelos resultados apresentados, parece que a infecção pelo PCV2 tem relação com o aumento da frequência da coinfecção (TTSuV1 + TTSuVk2) em fezes diarreicas. Esses resultados ainda reforçam que a via oral fecal pode ser uma importante rota de transmissão do TTSuV em animais jovens.

Ambos os gêneros do TTSuV foram encontrados infectando pulmão de suínos da terminação com frequências de coinfecção bem altas principalmente em associação com o PCV2 (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) tanto entre animais vacinados (50 %) como nos não vacinados (7 %) (Tabela 5), o que é esperado já que a essa frequência tende a aumentar com a idade dos animais. Altas frequências de infecção também foram encontradas para o TTSuV1 (76,7 %) e para o TTSuVk2 (73,3 %) em amostras de pulmão de suínos de diferentes idades (5 a 24 semanas) na Espanha (ARAMOUNI et al., 2010) e em 100 % das amostras pulmão de suínos da terminação (n = 31) testadas no estado do Paraná (DE ARRUDA LEME et al., 2013), demonstrando que o pulmão é um importante sítio de replicação do vírus.

A vacinação contra o PCV2 não previne a infecção nem a propagação do vírus, mas promove uma redução significativa da viremia, das lesões linfóides e

consequentemente aumento dos parâmetros zootécnicos, como por exemplo, redução da mortalidade e ganho de peso diário (OPRIESSNIG et al., 2009; MARTELLI et al., 2011). A menor frequência de infecção pelo PCV2 encontrada nos animais vacinados (72 %) em relação aos não vacinados (95 %) pode ser devido à baixa carga viral ou mesmo pela ausência de infecção viral do órgão pesquisado, já que outros autores relataram que a vacinação é capaz de promover a redução da frequência de infecção (NIETO et al., 2012).

Nossos resultados demonstram que no grupo dos não vacinados houve um aumento da frequência de infecção pelo TTSuV1 em animais PCV2 positivos (16 %), com relação aos PCV2 negativos (0), além disso em ambos os grupos, vacinados e não vacinados, a frequência da coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2) foi maior em associação com o PCV2, mas se essa associação está relacionada a doença clínica não se pode afirmar. A maioria dos órgãos examinados (77 %) é proveniente de animais que não foram vacinados contra o PCV2 e metade (51 %) destes órgãos apresentavam lesões macroscópicas compatíveis com pneumonia intersticial, caracterizadas por órgão não colapsado, áreas multifocais à difusas de consolidação, de cor vermelha escura a acastanha (dados não apresentados). A pneumonia intersticial foi associada com a infecção pelo PCV2 em amostras de campo, o que demonstra que parte dos animais poderia estar apresentando doença clínica no momento do abate (Opriessnig; Langohr, 2013).

A associação da maior frequência de infecção pelo TTSuV1 em amostras de pulmão de suínos com suspeita de Complexo de doenças respiratórias foi comprovada em um estudo realizado nos EUA (RAMMOHAN et al., 2012). Na população normal a frequência de infecção para o TTSuV1 foi de 47,34 % enquanto que na população com suspeita de PRDC essa frequência foi de 86,67 %, o que não ocorreu com o TTSuVk2 que teve frequências de infecção bem mais baixas nessas duas populações, 24,67 % e 26,67 % respectivamente. Foi demonstrado que o TTSuV1 esteve presente em 80 % das amostras positivas para PRRSV, em 81,8 % para SIV, em 75 % para *Mycoplasma hyopneumoniae* e em 77,78 para PCV2.

A influência da vacinação contra o PCV2 na frequência de infecção pelo TTSuV foi investigada anteriormente, mas diferente de nossos resultados, em um contexto de infecção subclínica pelo PCV2, nenhuma associação entre vacinação e

diminuição da frequência de infecção pelo TTSuV foi encontrada (LEE ET, 2012; NIETO et al., 2012).

Pelos resultados obtidos, a vacinação contra o PCV2 foi capaz de promover uma diminuição da frequência da coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2), assim como da infecção pelo PCV2, demonstrando ainda a associação entre o TTSuV1 e o PCV2 e consequentemente uma possível participação do TTSuV1 como um co-agente na manifestação clínica da PRDC.

Sequências de ambos os gêneros do TTSuV foram identificadas em amostras de suínos domésticos provenientes de granjas do Estado de São Paulo e suínos ferais (Porco Monteiro) do Pantanal. Dentre essas amostras foram encontrados quatro tipos virais diferentes para o TTSuV1 e sete subtipos para o TTSuVk2 (Figuras 8 e 9). Na população de suínos domésticos circulam os tipos 1a, 1b, 1c e os subtipos 2a, 2b, 2c, 2d, 2e e 2f, já entre a população de Porco Monteiro circula o tipo 1d e o subtipo 2g. Os dados mencionados aqui são os primeiros a relatar os diferentes genótipos do TTSuV circulantes no Brasil, pois até agora, somente duas sequências completas de suínos sendo uma do tipo 1b (AY823990) e outra do subtipo 2a (AY823991) foram descritas por pesquisadores do Instituto Osvaldo Cruz (NIEL; DINIZ-MENDES; DEVALLE, 2005).

A análise da filogenia do *Iotatorquevirus* demonstra que exceto pela sequência PM C22 nossos achados concordam com um estudo publicado recentemente que relata a divisão do gênero em três tipos (a, b e c), porém discordam da filogenia apresentada para o *Kappatorquevirus* com sete subtipos (a, b, c, d, e, f e g) (LI et al., 2013).

Uma sequência divergente foi identificada para TTSuV1 (PM C22) com um novo tipo proposto (1d) e quatro para o TTSuVk2 (AM 93 C3, PM C3, PM C10 e PM C15) com dois novos subtipos propostos (2d e 2g). Além dessas outras duas sequências divergentes foram identificadas para o TTSuV1 (AM66 C1 e AM66 C6) e mais duas para o TTSuVk2 (AM146 C3 e AM65 C2) mas que não formaram novos grupos. A diversidade encontrada para as amostras em ambos os gêneros do TTSuV pode ser indicativa de que linhagens diferentes circulam nas populações de suínos domésticos e ferais.

Pelos resultados obtidos com o Blastn (APÊNDICE C) na análise das sequências divergentes, coube a investigação de eventos de recombinação. Tais eventos podem gerar um viés na classificação filogenética do TTSuV como observado no

dendrograma obtido para a amostra recombinante PM C22 (tipo 1d) que se agrupou com amostras do tipo 1a (Figura 12).

Três eventos diferentes de recombinação foram detectados para cada gênero do TTSuV tanto em amostras de suínos domésticos como de Porco Monteiro. A recombinação ocorreu entre sequências do mesmo tipo ou subtipo (intra-genótipo), mas também, entre tipos e subtipos diferentes (inter-genótipo) e entre sequências de suínos domésticos e feráis (inter-hospedeiro). Apesar da população de Porco Monteiro viver livre e isolada na planície do Pantanal, alguns animais podem ter contato com suínos domésticos criados pela população local, principalmente na busca por alimentos. Sendo a via oral-fecal uma importante rota de transmissão esses animais acabam por se infectar com estirpes de vírus circulantes nas populações de suínos domésticos. Eventos de recombinação intra e inter-hospedeiros também foram descritos entre amostras de suínos domésticos e javalis na Romênia, mas estes eventos foram encontrados em uma região diferente do genoma, a ORF2 (CADAR et al. 2013). Adicionalmente, o evento de recombinação da amostra TTSuV1 AM66 C1 ainda comprova a existência de recombinação intra-hospedeiro (Quadro 5), pois houve troca de fragmentos entre dois tipos diferentes do TTSuV1 que coinfetavam o mesmo animal.

Assim como já foi relatado para outro vírus ssDNA circular, acredita-se que os eventos de recombinação no TTSuV se devem principalmente ao mecanismo de replicação usado pelo vírus, mecanismos de reparo da célula hospedeira ou ainda estão relacionados a estrutura do genoma viral (LEPIK et al., 2007; MARTIN et al., 2011). Confrontos entre complexos enzimáticos de replicação e transcrição ou quebras na cadeia de ssDNA da forma replicativa do dsDNA podem promover o deslocamento prematuro dos complexos replicativos. Quando esses complexos se associam a outro molde diferente e reiniciam a replicação, o resultado será um recombinante gerado pelo mecanismo conhecido como cópia-escolha (*copy choice*) (OWOR et al., 2007).

Outro exemplo é a via de reparo da célula hospedeira em pontos de ruptura da dupla fita de DNA, denominado de mecanismo de invasão de fita (*strand invasion*). Quebras na cadeia de DNA ativam nucleases que digerem as extremidade do DNA rompido de 5' para 3', esses fragmentos digeridos irão então se parear com sequências homólogas do DNA e seguirão sendo replicados (KOWALCZYKOWSKI, 2000).

Quando ocorre a invasão de uma fita simples de DNA em um DNA molde que é uma molécula covalentemente fechada circular, o complexo polimerase produz um

ssDNA recombinante através de múltiplas voltas em torno do molde o que potencialmente gera fitas de duas a três vezes maior que o genoma que posteriormente são convertidas em fitas duplas pelos processos celulares (JESKE; LUTGEMEIER; PREISS, 2001). Essas moléculas denominadas de dsDNA de alto peso molecular (hDNA), no caso dos Geminivírus são produzidas por um processo denominado recombinação dependente de replicação (RDR), o que parece ocorrer com os Anellovirus já que com frequência diferentes tamanhos de genoma do vírus (partículas subvirais) podem ser encontrados, indicando a ocorrência de danos ao DNA (PREISS; JESKE, 2010, LEPIK et al., 2007).

A recombinação no genoma do TTsuV foi detectada principalmente na região carboxi e amino-terminal da proteína do capsídeo. Pela organização do genoma do vírus essas regiões estão mais próximas de uma região de repetição rica em citocina e guanina (CG), formando uma estrutura denominada de *stem-loop* onde se localiza a origem da replicação. De acordo com Sarker e colaboradores, estas estruturas podem favorecer os eventos de recombinação, pois no momento da troca de fita é importante que sítios sinônimos estejam próximos (SARKER et al., 2014).

Mesmo na ausência dos fragmentos recombinantes as amostras de porco monteiro PM C22, PM C3, PM C10 e PM C15 e as amostras de suínos domésticos AM66 C6, AM146 C3 e AM93 C3 que não foram identificadas como recombinantes apresentaram-se divergente das demais. Dessa forma, entende-se que recombinação é um mecanismo importante utilizado pelos vírus para aumentar a diversidade genética, mas não é o único e só em associação com a mutação pode explicar tamanha variabilidade encontrada no TTsuV.

A baixa identidade encontrada tanto em nível de nucleotídeos quanto em nível de aminoácidos dentro dos grupos (espécies, tipos e subtipos) aliada ao fato de que mais de um genótipo foi encontrado na mesma amostra (Quadro 4), demonstram que provavelmente o TTsuV circula na população de suínos como quasiespécies.

A teoria de quasiespécies refere-se a uma população de mutantes gerados pela alta taxa de erros durante a replicação, mas também por eventos de recombinação e rearranjo molecular, no caso de vírus com genomas segmentados. As taxas de mutações são tão altas que a progênie viral gerada após a replicação em uma célula é muito diferente da parental. Os mutantes são fonte da adaptação e podem frequentemente determinar o comportamento biológico de uma população viral. A capacidade de mudar

o tropismo celular, adaptação a diferentes hospedeiros, mecanismos de escape do sistema imunológico e resistência aos agentes antivirais surgem desse repertório de variantes (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

Estudos em pacientes humanos comprovam que em infecções crônicas o TTV é capaz de mudar tão severamente a região hipervariável ocorrendo como quasiespécies e desta maneira se evadir da resposta imunológica do hospedeiro (NISHIZAWA et al., 1999).

A denominação de quasiespécies é constantemente empregada para os vírus RNA que por codificar uma RNA polimerase – RNA dependente desprovida de mecanismos de correção (atividade *proofreading*) geram uma prole com alta taxa de mutação. Já o TTSuV como utiliza a DNA polimerase celular e esta enzima possui atividade de correção deveria gerar descendentes com menor variabilidade, mas não é isso que acontece. A taxa de mutação do TTSuV é comparada à dos vírus RNA, por volta de $5,0 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano, que em um genoma de aproximadamente 2.800 nucleotídeos gera 1,4 substituição/genoma/ano.

Se por um lado a recombinação ocorre devido a interferências de mecanismos de reparo celular no genoma viral, por outro lado, as altas taxas de mutação no TTSuV se devem principalmente porque apesar dos mecanismos de reparo celular estarem disponíveis para atuar durante a replicação do genoma viral, ocorre uma falha em detectar e corrigir essas mutações.

O processo de pareamento errado de bases (*mismatch repair*) é direcionado pela metilação da sequência GATC próxima ao sítio de onde ocorreu o erro (FUKUI, 2010). Se o DNA permanece não metilado como no caso dos Geminivirus (ARGUELLO-ASTORGA et al., 2007) as enzimas celulares não são capazes de atuar na correção. Da mesma forma, no processo de reparo pela excisão de bases as enzimas DNA glicosilases reconhecem o erro no DNA fita dupla e como no sistema de replicação RCR o DNA do vírus permanece só momentaneamente fita dupla, escapa da ação corretora. Alternativamente proteínas virais podem interagir com fatores do hospedeiro alterando a fidelidade da polimerase (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008).

Os gráficos de entropia gerados para cada genótipo do TTSuV (APÊNDICE E) revelam que as substituições de aminoácidos na ORF1 do TTSuV são bastante frequentes. Ocorrem ao longo de todo o gene, porém, existem regiões onde essas

mutações se concentram, denominadas de regiões hipervariáveis (HVR). Essas regiões se localizam principalmente entre os resíduos de aminoácidos 300 – 450 (TTSuV1) e 250 – 420 (TTSuVk2).

Analisando as sequências de aminoácidos entre as variantes virais, sequências com 95 % de identidade de nucleotídeos ou mais, dos diferentes tipos ou subtipos do TTSuV fica evidente que uma maior substituição de aminoácidos ocorre na região intermediária da ORF1 mas também na região carboxi-terminal 3' (APÊNDICE F) que é a região mais externa do capsídeo, o que comprova que epítomos localizados nesta regiões provavelmente sofram pressão seletiva do sistema imunológico do hospedeiro.

A pressão de seleção média calculada pela proporção d_N/d_S para a ORF1 foi $d_N/d_S < 1$ para todos os genótipos (Quadro 6), isso significa que pressão negativa ou purificadora ocorra com maior frequência devido a restrições funcionais da proteína provavelmente relacionada a sua função dupla de codificar uma proteína do capsídeo e outra proteína com função na replicação viral (CORTEY et al., 2010). Como consequência das elevadas taxas de mutação ocorre uma expansão rápida de sequências que poderiam perder informação biológica e neste caso a seleção negativa ou purificadora atua eliminando mutantes deletérios da população (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

Sítios selecionados positivamente foram identificados na região amino-terminal (3, 4, 64), região hipervariável (315) e região carboxi-terminal (515, 550) do TTSuV1 e região hipervariável HVR (297, 366, 369 e 387) e carboxi-terminal (507, 513, 617 e 619) do TTSuVk2. Dentre os sítios sob pressão de seleção alguns foram identificados sob seleção positiva episódica e pervasiva e localizam principalmente na região hipervariável do tipo 1a, 2a e 2b e na região amino-terminal do 1b (Quadro 6).

A maioria dos sítios na ORF1 do TTSuV está sob pressão purificadora como demonstrado pela d_N/d_S média calculada para toda a ORF1. Quando utilizamos métodos que permitem a variação da taxa d_N/d_S para cada sítio individualmente é possível detectar uma pequena proporção que está sob pressão positiva, porém os modelos utilizados assumem que essa pressão positiva se mantém constante ao longo do tempo e afeta todas as linhagens, o que biologicamente na maioria das vezes não é justificado. O que ocorre é que as taxas de evolução podem mudar dentro de cada sítio e para cada linhagem. Por exemplo, um sítio que passou por seleção positiva pode experimentar logo em seguida seleção purificadora para que a mutação ocorrida anteriormente, que

conferiu maior adaptabilidade, não seja perdida. Dessa maneira acredita-se que a maioria dos sítios evolui sob pressão episódica (MURRELL et al., 2012).

A região amino-terminal é rica em resíduos de arginina e supostamente está envolvida na ligação com DNA viral para posterior encapsidação (KAKKOLA et al., 2008). Nessa região foram localizados epítomos de maior acessibilidade em quase todos os genótipos do TTSuV. A região carboxi-terminal, rica em resíduos de serina é a mais hidrofílica (APÊNDICE D) ao longo de toda proteína e onde foram mais frequentemente detectados epítomos lineares mas também mostrou ser antigênica e acessível, ou seja, é a região que mais agrupa qualidades relacionadas à exposição de epítomos. Com base na ultra-estrutura do vírus da anemia das galinhas (CAV) a porção C-terminal forma a parte externa do capsídeo que fica exposta na superfície do virion, a porção N-terminal se localiza internamente ao capsídeo ligada ao DNA e a porção intermediária forma a concha interna do capsídeo (HUANG et al., 2012).

A região C-terminal é a que tem se mostrado mais atrativa para o desenvolvimento de testes diagnósticos pois apresenta alta reatividade sorológica tanto em suínos como em pacientes humanos (JAROSOVA; CELER, 2013; LIU et al., 2013). Além disso se mostrou altamente conservada entre genótipos do *Iotatorquevirus* mas não entre os *Iotatorquevirus* e *Kappatorquevirus*, servindo para diferenciar títulos de anticorpos entre os dois gêneros (HUANG et al., 2012).

Diferentemente de todas as outras sequências do TTSuV1 a sequência PM C22 tipo 1d apresentou epítomo linear fora da região hipervariável ou C-terminal, no resíduo 109. Próximo a essa região também foi encontrado um códon de parada precoce na posição 140 indicando que uma proteína menor possa ser expressa. Em alguns isolados do TTV humano, os codons de parada são encontrados no meio de ORF1 encurtando ou interrompendo a suposta proteína (JELCIC et al., 2004) e formando vírus defeituosos (POLLICINO et al., 2003).

Neste caso, a existência de variantes que coinfectam um mesmo hospedeiro pode estar relacionada ao fato de que somente algumas partículas virais tenham os componentes necessários para infectar uma célula e assim sejam necessárias várias partículas diferentes infectando uma mesma célula para que o vírus consiga produzir sua progênie (KHUDYAKOV et al., 2000). Isso comprova que as partículas virais não atuam de forma independente, mas sim através de cooperação ou interferência entre os

componentes da população principalmente através de seus produtos de expressão (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

No Brasil os relatos sobre o Torque teno vírus suíno se restringem a frequências de infecção de ambos os gêneros em suínos de diferentes idades em associação ou não com o PCV2. Com relação à diversidade molecular apenas duas sequências completas do genoma viral foram depositadas no Genbank e, portanto, não são conhecidos os tipos e subtipos virais que circulam na população de suínos doméstico e ferais. Seria interessante caracterizar amostras de outras regiões geográficas do Brasil porque como demonstram nossos resultados, parecem existir estirpes diferentes do vírus que circulam no sudeste e centro-oeste do país entre as duas populações.

O sequenciamento da ORF1 que mostrou ser a proteína com participação na resposta imunológica pode fornecer pistas para um melhor entendimento dos mecanismos que o vírus utiliza para escapar das defesas do hospedeiro estabelecendo infecção crônica. Além disso, regiões identificadas relacionadas a tipos ou subtipos virais específicos podem servir como alvo em testes diagnósticos possibilitando um maior conhecimento sobre o tropismo e a patogenia viral.

7 CONCLUSÕES

- O TTSuVk2 foi mais frequente que o TTSuV1 infectando tanto fetos abortados quanto leitões natimortos.
- A frequência de infecção pelo TTSuVk2 + PCV2 foi maior nos fetos abortados em comparação aos leitões natimortos

- Porcas e leitões da creche foram mais frequentemente infectados pelo TTSuV1 enquanto que leitões do crescimento pelo TTSuVk2.
- Diferenças nas frequência de infecção para o TTSuV1 foram observadas entre porcas e leitões da creche e entre leitões da creche e crescimento.
- Diferenças nas frequência de infecção para o TTSuV1 + TTSuVk2 foram observadas entre porcas e leitões da creche e porcas e leitões do crescimento.
- Diferenças nas frequência de infecção para o TTSuV1+TTSuVk2+PCV2 foram observadas entre leitões da creche e leitões do crescimento.
- Houve maior frequência de eliminação TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2 pelas fezes diarreicas do que pelas não diarreicas
- Nas fezes diarreicas, a eliminação TTSuV1 + TTSuVk2 foi mais frequente nas amostras PCV2 positivas que nas PCV2 negativas.
- As frequências de coinfeção com os três agentes (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) encontradas em amostras de pulmão de suínos da terminação foram bem altas tanto em animais vacinados como em não vacinados contra o PCV2.
- Entre as amostras de pulmão de animais não vacinados contra o PCV2, a frequência de infecção pelo TTSuV1 foi maior nas amostras PCV2 positivas em comparação com as PCV2 negativas.
- A coinfeção pelo três agentes (TTSuV1 + TTSuVk2 + PCV2) foi maior nos animais não vacinados em comparação com os vacinados.
- Tanto nos animais vacinados quanto nos não vacinados houve um aumento da frequência da coinfeção (TTSuV1 + TTSuVk2) nos animais PCV2 positivos em comparação com os PCV2 negativos.

- Foram caracterizados quatro tipos do TTSuV1 e sete subtipos do TTSuVk2 circulantes em rebanhos de suínos domésticos e Porco Monteiro.
- Foi proposto um novo tipo para o TTSuV1, 1d e dois novos subtipos para o TTSuVk2, 2d e 2 g.
- Foram encontradas estirpes diferentes do TTSuV que circulam entre a população de suínos domésticos e ferais.
- Eventos de recombinação intra-hospedeiro, inter-hospedeiro, intra-genótipo e inter-genótipo foram detectados para ambos os gêneros do TTSuV.
- As substituições de aminoácidos foram observadas com maior frequência na região intermediária da ORF1 nos diferentes genótipos.
- As regiões hipervariável e carboxi-terminal da proteína do capsídeo apresentaram sítios de seleção positiva pervasiva e episódica.
- Foram encontrados motivos de aminoácidos conservados entre genótipos do TTSuV
- A região carboxi-terminal da ORF1 foi a que apresentou maior número de características relacionadas à exposição de epítomos na superfície da proteína

REFERÊNCIAS

- ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Pordutora e Exportadora de Carne Suína. **Relatórios Anuais da Abipecs**. São Paulo, 2012. Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf). Acesso: 11 jul. 2014.
- ALLAN, G.M.; MEEHAN, B.; TODD, D.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; CLARK E.G.; HARDING J.; ESPUNA, E.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. **Veterinary Record**, v. 142, p. 467-468, 1998.
- ALARCON, P.; RUSHTON, J.; WIELAND, B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - an economic disease model. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, n. 2, p. 88-102. 2013.
- ARAMOUNI, M.; SEGALÉS, J.; CORTEY, M.; KEKARAINEN, T. Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 350-353, 2010.
- ARAMOUNI, M.; SEGALÉS, J.; SIBILA, M.; MARTIN-VALLS, G. E.; NIETO, D.; KEKARAINEN, T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v.153, 377-381, 2011.
- ARGUELLO-ASTORGA, G. R.; ASCENCIA-IBÁÑEZ, J. T.; DALLAS, M. B.; OROZCO, B. M.; HANLEY-BOWDOIN, L. High- frequency reversion of geminivirus replication protein mutants during infection. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11005-11015, 2007.
- BEACH, N.M.; MENG, X.J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, n. 1-2, p. 33-42, 2012.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO M.; MAGGI F.; FORNAI C.; FREER G.; VATTERONI, M.L. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 98-113, 2001.
- BIAGINI, P. Classification of TTV and related viruses (Anelloviruses). **Current Topics in Microbiology Immunology**, v. 331, p. 21-33, 2009.

BIAGINI, P.; CHARREL, R. N.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X.
Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 128-129, 2003.

BIAGINI, P.; GALLIAN, P.; ATTOUI, H.; CANTALOUBE, J.F.; TOUINSSI, M.; DE MICCO, P.; DE LAMBALLERIE, X. Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. **Journal of Clinical Virology**, v. 22, n. 1, p. 91-99, 2001.

BIGARRÉ, L.; BEVEN, V.; DEBOISSÉSON, C.; GRASSLAND, B.; ROSE, N.,
BIAGINI, P.; JESTIN, A. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 631-635, 2005 .

BLOMSTRÖM, A.L.; BELÁK, S.; FOSSUM, C.; FUXLER, L.; WALLGREN, P.;
BERG, M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. **Virus Research**, v. 152, p. 59-64, 2010.

BRASSARD, J.; GAGNE, M.J.; LAMOUREUX, L.; INGLIS, G.D.; LEBLANC, D.;
HOUDE, A. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 271-276, 2007.

BRINK, M.; STÅHL, K.; MASEMBE, C.; OKURUT, A.R.; BERG, M.;
BLOMSTRÖM, A.L. First time molecular detection and phylogenetic relationships of torque teno sus virus 1 and 2 in domestic pigs in Uganda: further evidence for a global distribution. **Virology Journal**, v. 9, p. 39-43, 2012.

BROUGH, C.L.; GARDINER, W.E.; INAMDAR, N.M.; ZHANG, X.Y.; EHRLICH, M.; BISARO, D.M. DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 703-712, 1992.

CADAR, D.; KISS, T.; ÁDÁM, D.; CSÁGOLA, A.; NOVOSEL, D.; TUBOLY, T.
Phylogeny, spatio-temporal phylodynamics and evolutionary scenario of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) in wild boars: Fast dispersal and high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 200-213, 2013.

CORNELISSEN-KEIJERS, V.; JIMÉNEZ-MELSIÓ, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J.; VAN DEN BOR, E.; KEKARAINEN, T. Discovery of a novel Torque teno sus virus species: genetic characterization, 2 epidemiological assessment, and disease association. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 12, p. 2682-2691, 2012.

CORTEY, M.; MACERA, L.; SEGALÉS, J.; KEKARAINEN, T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 125-131, 2011.

DE ARRUDA LEME, R.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Torque teno sus virus infection in suckling piglets from Brazilian pig herds. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, n. 8, 1885-1890, 2012.

DE ARRUDA LEME, R.; RIBEIRO, J.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Simultaneous infection with distinct strains of Torque teno susvirus (TTSuV) in healthy slaughter-age pigs. **Veterinary Research Communication**, v. 37, p. 183-186, 2013.

DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral Quasispecies Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159-216, 2012.

DUFFY, S.; HOLMES, E.C. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. **Journal of Virology**, v. 82, p. 957-965, 2008.

ELLIS, J.A.; ALLAN, G.; KRAKOWKA, S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2- associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **American. Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1608-1614, 2008.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, p. 836-839, 1985.

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of nucleic acids**, v. 27. ID 260512, 2010. Doi:10.4061/2010/260512.

GALLEI, A.; PESCH, S.; ESKING, W. S.; KELLER, C.; OHLINGER, V. F. Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 202-212, 2010.

GERGELY, P.J.R.; PERL, A.; POOR, G. Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: does it play a role in autoimmune rheumatic diseases? **Autoimmune Reviews**, v. 6, p. 5-9, 2006.

GERVÁSIO, E.D. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural. **Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf). Acesso: 11 jul. 2014.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIJIKATA, M.; TAKAHASHI, K.; MISHIRO, S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. **Virology**, v. 260, p.17-22, 1999.

HUANG, Y. W.; DRYMAN, B. A.; HARRALL, K. K.; VAUGHN, E. M.; ROOF, M. B.; MENG, X. J. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species- or type specific porcine Torque teno viruses, **Journal of Virological Methods**, v. 170, p. 140-146, 2010a.

HUANG, Y.W.; NI, Y.Y.; DRYMAN, B.A.; MENG, X. J. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. **Virology**, v. 396, p. 289-297, 2010b.

HUANG, Y.W.; HARRALL, K.K.; DRYMAN, B.A.; BEACH, N.M.; KENNEY, S.P.; OPRIESSNIG, T.; VAUGHN, E. M.; ROOF, M.B.; MENG, X.J. Expression of the putative ORF1 capsid protein of porcine Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. **Virus Research**, v. 158, p. 79-88, 2011.

HUANG, Y.W.; PATTERSON, A. R.; OPRIESSNIG, T.; DRYMAN, B. A.; GALLEI, A.; HARRALL, K.K.; VAUGHN, E. M.; ROOF, M. B; MENG, X.J. Rescue of a porcine anellovirus (Torque teno sus virus 2) from cloned genomic DNA in pigs. **Journal of Virology**, v. 86, p. 6042-6054, 2012.

HUANG, Y.W.; HARRALL, K.K.; DRYMAN, B.A.; OPRIESSNIG, T.; VAUGHN, E.M, ROOF, M.B.; MENG, X.J. Serological profile of Torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and 2), and between porcine and human anelloviruses, **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10628-10639, 2012.

ICTV (2011) ICTVdB. The universal virus database of the **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em:
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>. Acesso em: 18 jun. 2014.

JAROSOVA, V.; POGRANICHNIY, R.; CELER, V. Prevalence and age distribution of porcine torque teno sus virus (TTSuV) in the Czech Republic. **Folia Microbiologica**, v. 56, p. 90-94, 2011.

JAROSOVA, V.; CELER, V. Preliminary epitope mapping of Torque Teno Sus Virus 1 and 2 putative capsid protein and serological detection of infection in pigs. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 1351-1356, 2013.

JELCIC, I.; HOTZ-WAGENBLATT, A.; HUNZIKER, A.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.M. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7498-7507, 2004.

JESKE, H.; LUTGEMEIER, M.; PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of abutilon mosaic virus. **EMBO Journal**, v. 20, p. 6158-6167, 2001.

KAKKOLA, L.; HEDMAN, K.; QIU, J.; PINTEL, D.; SODERLUND-VENERMO, M. Replication of and protein synthesis by TT viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 331, p. 53-64, 2009.

KAMADA K, KAMAHORA T, KABAT P, HINO S. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. **Virology**, v.321, p.341–348, 2004.

KASIRGA, E.; SANLIDA, G.T.; AKCALI, S.; KESKIN, S.; AKTAS, E.; KARAKOC Z.; HELVACI, M.; SOZEN, G.; KUZU, M. Clinical significance of TT virus infection in children with chronic hepatitis B. **Pediatric International**, v. 47, p. 300-304, 2005.

KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS)- affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**, v.87, p. 833-837, 2006.

KEKARAINEN, T.; LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. **Theriogenology**, v. 68, p. 966-971, 2007.

KEKARAINEN, T.; MCCULLOUGH, K.; FORT, M.; FOSSUM, C.; SEGALÉS J.; ALLAN, G.M. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.136, n. 3-4, p. 185-193, 2010.

KOSAKOVSKY POND, S.L.; FROST, S.D. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection., **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, p. 1208-1222, 2005.

KOSAKOVSKY POND, S.L.; POSADA, D.; GRAVENOR, M.B.; WOELK, C.H.; FROST, S.D. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 1891-1901, 2006.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, p. 172-174, 1990.

KOWALCZYKOWSKI, S.C. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n 4, p. 156-165, 2000.

KRAKOWKA, S.; HARTUNIAN, C.; HAMBERG, A.; SHOUP, D.; RINGS, M.; ZHANG, Y.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1615-1622, 2008.

KHUDYAKOV, Y. E.; CONG, M. E.; NICHOLS, B.; REED, D.; DOU, X. G.; VIAZOV, S. O.; CHANG, J.; FRIED, M. W.; WILLIAMS, I. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. **Journal of Virology**, v. 74, p. 2990-3000, 2000.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, p. 2, 2006.

LEARY, T. P.; ERKER, J. C.; CHALMERS, M. L.; DESAI, S. M; MUSHAHWAR, I. K. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2115-2120, 1999.

LEE, S.; SHIN, J.; KIM, C.; LYOO, Y.S. Comparison of Torque Teno Sus Virus (TTSuV) viral load in Porcine Circovirus Type 2 vaccinated and non-vaccinated pig herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1039-1041, 2012.

LEPPIK, L.; GUNST, K.; LEHTINEN, M.; DILLNER, J.; STREKER, K.; DE VILLIERS, E.M. In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 9346-9356, 2007.

LI, K.; WANG, L.Q.; WU, Y.Y.; CHAO, A.J.; LU, Q.W.; WEI, Z.Y.; CUI, B.A.; CHEN, H.Y. Molecular detection and genomic characterization of Torque teno sus virus 1 and 2 from domestic pigs in central China. **Virus Genes**, v. 46, n. 3, p. 479-486, 2013.

LIU, J. GUO, L.; ZHANG, L.; WEI, Y.; HUANG, L.; WU, H.; LIU, C. Three new emerging subgroups of torque teno sus viruses (TTSuVs) and co-infection of TTSuVs with porcine circovirus type 2 in China. **Virology Journal**, v. 10, p. 189-199, 2013.

MAGGI, F.; BENDINELLI, M. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 331, p. 65-90, 2009.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZPUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain.

Veterinary Journal, v. 169, p. 454-456, 2005.

MANKERTZ, A.; MANKERTZ, J.; WOLF, K.; BUHK, H.J. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 381-384, 1998.

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

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Suíños**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>. Acesso: 11 jul. 2014.

MARTELLI, P.; FERRARI, L.; MORGANTI, M.; DE ANGELIS, E.; BONILAURI, P.; GUAZZETTI, S.; CALEFFI, A.; BORGHETTI, P. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 339-351, 2011.

MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2462-2463, 2010.

MARTIN, D.P.; BIAGINI, P.; LEFEUVRE, P.; GOLDEN, M.; ROUMAGNAC, P. VARSANI, A. Recombination in Eukaryotic Single Stranded DNA Viruses. **Viruses**, v. 3, p. 1699-1738, 2011.

MARTINEZ, L.; KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; RUIZ-FONS, F.; VIDAL, D.; GORTAZAR, C.; SEGALÉS, J. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 223-229, 2006.

MARTÍNEZ-GUINÓ L.; SIBILA M.; KEKARAINEN T.; MARTÍN-VALLS G.; SEGALÉS J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. **Theriogenology**, v. 71, p. 1390-1395, 2009.

MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; BALLESTER, M.; SEGALÉS, J. & KEKARAINEN, T. Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins, **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2446-2457, 2011.

MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; KEKARAINEN, T.; MALDONADO, J.; ARAMOUNI, M.; LLORENS A.; SEGALÉS, J. Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. **Theriogenology**, v. 74, p. 277-281, 2010.

MENG, X.J. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 1, p. 85-102, 2012.

MEI, M.; ZHU, L.; WANG, Y.; XU, Z.; ZHAO, L.; PENG, X.; WU, Y.; LI, S.; GUO, W. Histopathological investigation in porcine infected with torque teno sus virus type 2. **Virology Journal**, v. 8, p. 545-554, 2011.

MIYATA H, TSUNODA H, KAZI A, YAMADA, A.; ALI KHAN, M.; MURAKAMI, J.; KAMAHORA, T.; SHIRAKI, K.; HIN, S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. **Journal of Virology**, v. 73, p. 3582-3586, 1999.

MUSHAHWAR, I.K.; ERKER, J.C.; MUERHOFF, A.S.; LEARY, T.P.; SIMONS, J.N.; BIRKENMEYER, L.G.; CHALMERS, M.L.; PILOT-MATIAS, T.J.; DESAI, S.M. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 3177-3182, 1999.

MURRELL, B.; WERTHEIM, J.O.; MOOLA, S.; WEIGHILL, T.; SCHEFFLE, K.; KOSAKOVSKY POND, S.L. Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 7, e1002764, 2012. Doi: 10.1371/journal.pgen.1002764.

NIEL, C.; DINIZ-MENDES, L.; DEVALLE, S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1343-1347, 2005.

NIETO, D.; M. ARAMOUNI, L. GRAU-ROMA, J. SEGALÉS, E T. KEKARAINEN. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 152, p. 284-290, 2011.

NIETO, D.; ARAMOUNI, M.; SIBILA, M.; FRAILE, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Lack of effect of piglet vaccination against Porcine circovirus type (PCV2) on serum viral loads of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2). **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 8-12, 2012.

NIETO, D.; KEKARAINEN, T.; ARAMOUNI, A.; SEGALÉS, J. Torque teno sus virus 1 and 2 distribution in tissues of porcine circovirus type 2-systemic disease affected and age-matched healthy pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 364-367, 2013.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; KONISHI, K.; YOSHIZAWA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, p. 92-97, 1997.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; AIKAWA, T.; SUGAI, Y.; KONISHI, K.; AKAHANE, Y.; UKITA, M.; TANAKA, T.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. **Journal of Virology**, v. 73, n. 11, p. 9604-9608, 1999.

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; TAKAHASHI, M.; ASABE, S.; TSUDA, F.; YOSHIKAWA, A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. **Virology**, v. 288, p. 358-368, 2001.

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; TAWARA, A.; PENG, Y.; TAKAHASHI, M.; KISHIMOTO, J.; TANAKA, T.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. **Virology**, v. 25; n. 2, p. 368-378, 2000.

OKAMOTO, H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 331, p. 1-20, 2009.

OKAMOTO, H.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; TAWARA, A.; FUKAI, K.; MURAMATSU, U.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1291-1297, 2002.

OPRIESSNIG, T.; MENG X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.R.; MADSON, D.M.; PAL, N.; HALBUR, P.G. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1002-1007, 2009.

OPRIESSNIG, T.; LANGOHR, I. Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 23-38, 2013.

ORR, H.A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature Reviews and Genetics**, v. 10, p. 531-539, 2009.

OWOR, B. E.; D. P. MARTIN, D. N. SHEPHERD, R. EDEMA, A. L. MONJANE, E. P. RYBICKI, J. A. THOMSON, AND A. VARSANI. Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3154-3165, 2007.

PARKER, J. M.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, p. 5425-5432, 1986.

PÉREZ, L.J.; DÍAZ DE ARCE, H.; FRIAS, M.T.; PERERA, C.A.; GANGES, L.; NÚÑEZ, J.I. Molecular detection of Torque teno sus virus in lymphoid tissues in concomitant infections with other porcine viral pathogens. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 154-157, 2011.

PETERS, M.A.; JACKSON, D.C.; CRABB, B.S.; BROWNING, G.F. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 39566-39573, 2002.

PETERS, M.A.; CRABB, B.S.; WASHINGTON, E.A. Site directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class 1 expression. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 823-831, 2006.

POLLICINO, T.; RAFFA, G.; SQUADRITO, G.; COSTANTINO, L.; CACCIOLA, I.; BRANCATELLI, S.; ALAFACI, C.; FLORIO, M.G.; RAIMONDO, G. TT virus has a ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 10, n. 2, p. 95-102, 2003.

POZZUTO, T.; MUELLER, B.; MEEHAN, B.; RINGLER, S.S.; MCINTOSH, K.A.; ELLIS, J.A.; MANKERTZ, A.; KRAKOWKA, S. In utero transmission of porcine torque teno viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 375-379, 2009.

PREISS, W.; JESKE, H. Multitasking in replication is common among geminiviruses. **Journal of Virology**, v. 77, p. 2972-2980, 2003.

RAMMOHAN, L.; XUE, L.; WANG, C.; CHITTICK, W.; GANESAN, S.; RAMAMOORTHY, S. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 61-68, 2012.

RITTERBUSCH, G.A.; ROCHA, C.A.; MORES, N.; SIMON, N.L.; ZANELLA, E.L.; COLDEBELLA, A.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Natural co-infection of torque teno virus and porcine circovirus 2 in the reproductive apparatus of swine. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 519-523, 2012.

SARKER, S., PATTERSON, E.I.; PETERS, A.; BAKER, A.G.; FORWOOD, J.K.; GHORASHI, S. A.; HOLDSWORTH, M.; BAKER, R.; MURRAY, N.; RAIDAL, S.R. Mutability Dynamics of an Emergent Single Stranded DNA Virus in a Naive Host. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e85370, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0085370.

SAVIC, B., MILICEVIC, V., BOJKOVSK, J., KURELJUSIC, B., IVETIC, V., PAVLOVIC, I. Detection rates of the swine torque teno viruses (TTVs), porcine circovirus type 2 (PCV2) and hepatitis E virus (HEV) in the livers of pigs with hepatitis. **Veterinary Research Communication**, v. 34, p. 641-648, 2010. Doi 10.1007/s11259-010-9432-z

SEGALÉS, J.; MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; CORTEY, M.; NAVARRO, N.; HUERTA, E.; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; KEKARAINEN, T. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 199-207, 2009.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, n. 1-2, p. 10-19, 2012.

SIBILA, M.; MARTINEZ-GUINO, L.; HUERTA, E.; MORA, M.; GRAU-ROMA, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 354-358, 2009a.

SIBILA, M.; MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; HUERTA, E.; LLORENS, A.; MORA, M.; GRAU-ROMA, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 213-218, 2009b.

SUZUKI, T.; SUZUKI, R.; LI, J.; HIJIKATA, M.; MATSUDA, M.; LI, T.-C.; MATSUURA, Y.; MISHIRO, S.; MIYAMURA, T. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. **Journal of Virology**, v. 78, p. 10820-10824, 2004.

TAIRA, O.; OGAWA, H.; NAGAO, A.; TUCHIYA, K.; NUNOYA, T.; UEDA, S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex, **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 347-350, 2009.

TAKAHASHI, K.; OHTA, Y.; MISHIRO, S. Partial 2.4-kb sequences of TT virus (TTV) genome from eight Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications. **Hepatology Research**, v. 12, n. 2, p. 111-120, 1998.

TAMURA K, STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2719, 2013.

THACKER, E.L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, p. 551-565, 2001.

TSHERING, C.; TAKAGI, M.; DEGUCHI, E. Detection of Torque Teno Sus Virus Types 1 and 2 by Nested Polymerase Chain Reaction in Sera of Sows at Parturition and of Their Newborn Piglets Immediately after Birth Without Suckling Colostrum and at 24 hr after Suckling Colostrum **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 3, p. 315-319, 2012.

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

WU, Z.; WANG, H.; YANG, X.; GUAN, Z., ZHOU, Y. Molecular detection of Torque teno virus in different breeds of swine. **Virology Journal**, v. 8, p. 503-510, 2011.

XIAO H, LUO K, YANG S, LUO, K.; YANG, S.; WANG, Y.; LIANG, W. Tissue tropism of the TTV in experimentally infected rhesus monkeys. **Chinese Medical Journal (English Edition)**, v. 115, p. 1088-1090, 2002.

XIAO, C.T.; GIMÉNEZ-LIROLA, L.; HUANG, Y.W.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. The prevalence of Torque teno sus virus (TTSuV) is common and increases with the age of growing pigs in the United States. **Journal of Virological Methods**, v. 183, n. 1, p. 40-44, 2012.

ZHANG, Z.; WANG, Y.; FAN, H.; LU, C. Natural infection with torque teno sus virus 1 (TTSuV1) suppresses the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccination. **Archives of Virology**, v. 157, n. 5, p. 927-933, 2012.

ZHENG, H.; L. YE, X. FANG, B. LI, Y. WANG, X. XIANG, L. KONG, W. WANG, Y. ZENG, L. YE, Z. WU, Y. SHE, AND X. ZHOU. Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 protein suppresses NF-KB pathways via interaction with IKB kinases. **Journal of Virology**, v. 81, p. 11917-11924, 2007.

ZHU, C.X.; YUAN, C.L.; CUI, L.; YU, Y.; LIU, Z.W.; ZHAO, W.; HUA, X.G. Molecular detection of Torque teno sus virus from tissues samples of sick pigs in China. **Virus Research**, v. 165, p. 225-230, 2012.

APÊNDICE A – Sequências completas depositadas no Genbank utilizadas na análise *in silico* para desenho dos pares de iniciadores senso e anti-senso para amplificação da ORF1 do TTSuV1

continua

Acesso Genbank	Ano	Hospedeiro	Amostra	Origem
AY823990	2005	Suíno	Soro	Brasil
AB076001	2002	Suíno	Soro	Japão
GQ120664	2005	Suíno	Soro	Canadá
GU188045	2008	Suíno	Soro	Alemanha
GU450331	2008	Suíno	-	China
GU456383	2008	Suíno	Soro/sêmen	Estados Unidos
GU456384	2008	Suíno	Soro/sêmen	Estados Unidos
GU570198	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570199	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570200	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570201	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570202	2010	Suíno	Soro	Espanha
HM633242	2009	Suíno	-	China
HM633243	2009	Suíno	-	China
HM633244	2009	Suíno	-	China
HM633245	2009	Suíno	-	China
HM633246	2009	Suíno	-	China
HM633247	2009	Suíno	-	China
HM633248	2009	Suíno	-	China
HM633249	2009	Suíno	-	China
HM633250	2009	Suíno	-	China
HM633251	2009	Suíno	-	China
HM633252	2009	Suíno	-	China
HM633253	2009	Suíno	-	China
HM633254	2009	Suíno	-	China
HM633255	2009	Suíno	-	China
HM633256	2009	Suíno	-	China
HM633257	2009	Suíno	-	China
HM633258	2009	Suíno	-	China
JF694116	2010	Suíno	-	China
JF694117	2010	Suíno	-	China
JF937660	2009	Suíno	Soro	China
JF937661	2009	Suíno	Soro	China
JF937662	2009	Suíno	Soro	China

JQ933527	2011	Suíno	Soro	China
----------	------	-------	------	-------

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

continuação

APÊNDICE B – Sequências completas depositadas no Genbank utilizadas na análise *in silico* para desenho dos pares de iniciadores senso e anti-senso para amplificação da ORF1 do TTSuVk2

Acesso Genbank	Ano	Hospedeiro	Amostra	Origem
AY823991	2005	Suíno	Soro	Brasil
GU188046	2008	Suíno	Soro	Alemanha
GU456385	2008	Suíno	Soro/sêmen	Estados Unidos
GU456386	2008	Suíno	Soro/sêmen	Estados Unidos
GU570197	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570203	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570204	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570205	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570206	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570207	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570208	2010	Suíno	Soro	Espanha
GU570209	2010	Suíno	Soro	Espanha
HM633214	2009	Suíno	-	China
HM633215	2009	Suíno	-	China
HM633216	2009	Suíno	-	China
HM633217	2009	Suíno	-	China
HM633218	2009	Suíno	-	China
HM633219	2009	Suíno	-	China
HM633220	2009	Suíno	-	China
HM633221	2009	Suíno	-	China
HM633222	2009	Suíno	-	China
HM633223	2009	Suíno	-	China
HM633224	2009	Suíno	-	China
HM633225	2009	Suíno	-	China
HM633226	2009	Suíno	-	China
HM633227	2009	Suíno	-	China
HM633228	2009	Suíno	-	China
HM633229	2009	Suíno	-	China
HM633230	2009	Suíno	-	China
HM633231	2009	Suíno	-	China
HM633232	2009	Suíno	-	China

HM633233	2009	Suíno	-	China
HM633234	2009	Suíno	-	China
HM633235	2009	Suíno	-	China
HM633236	2009	Suíno	-	China
HM633237	2009	Suíno	-	China
HM633238	2009	Suíno	-	China
HM633239	2009	Suíno	-	China
HM633240	2009	Suíno	Pulmão	China
HM633241	2009	Suíno	Pulmão	China
HQ204188	2010	Suíno	Soro	China
JF694118	2010	Suíno	-	China
JF937656	2010	Suíno	Soro	China
JF937657	2009	Suíno	Soro	China
JQ664305	2011	Suíno	-	China
JF937658	2009	Suíno	Soro	China
JF937659	2009	Suíno	Soro	China

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

continuação

APÊNDICE C – Alinhamento local de nucleotídeos da amostra (Blastn) TTSuV1 PM C22

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

APÊNDICE D – Gráfico de entropia gerado para o conjunto de sequências dos tipos 1a, 1d e 1c do TTSuV1 e subtipos 2a, 2b, 2c, 2e, 2f e 2g do TTSuVk2

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014)

APÊNDICE E – Gráfico de hidrofiliidade média gerado para o conjunto de seqüências de aminoácidos do TTSuV1 e do TTSuVk2

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).

APÊNDICE F – Gráfico de entropia gerado para o conjunto de variantes do TTSuV1 (A, B e C) e do TTSuVk2 (D, E e F)

Fonte: (FAVERO, C.M., 2014).