

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS DA INFECÇÃO
PELO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) NO SISTEMA VASCULAR**

FERNANDA SIMONE MARKS

Porto Alegre, fevereiro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DOS EFEITOS DA INFECÇÃO
PELO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) NO SISTEMA VASCULAR**

FERNANDA SIMONE MARKS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração Microbiologia.

Orientador: **Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**

Co-orientador: **Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini**

Porto Alegre, fevereiro de 2010

M346c Marks, Fernanda Simone

Caracterização *in vivo* e *in vitro* dos efeitos da infecção pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2) no sistema vascular. / Fernanda Simone Marks - Porto Alegre: UFRGS, 2010.

76 f.; il. – Dissertação (Mestrado.) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2010. Cláudio Wageck Canal, Orient. ; Luís Gustavo Corbellini, Co-orient.

1. Microbiologia 2. Virologia veterinária – circovírus suíno 3. Hemostasia 4. Endotélio I. Canal, Cláudio Wageck, Orient. II. Corbellini, Luís Gustavo, Co-orient. III. Título.

CDD 616.019

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Fernanda Simone Marks

Caracterização *in vivo* e *in vitro* dos efeitos da infecção pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2) no sistema vascular

APROVADA EM 25 DE FEVEREIRO DE 2010 POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini

Co-orientador

Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Londrina, PR, Brasil

Dra. Rejane Schaefer

Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves (CNPISA)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)
Concórdia, SC, Brasil

Dra. Carla Denise Bonan

Departamento de Biologia Celular e Molecular
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)
Porto Alegre, RS, Brasil

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Virologia** da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Curso de mestrado realizado com bolsa da Capes.

“Il n'existe pas de sciences appliquées, mais seulement des applications de la science.”
(There are no such things as applied sciences, only applications of science)

Louis Pasteur, 1872

In Comptes Rendus des Travaux du Congrès viticole et séricole de Lyon

“The filtrate contained a previously undiscovered disease agent so small as to pass through the pores of a filter capable of retaining the smallest known bacteria. If it were a soluble poison it must have been amazingly active. An amount of filtrate corresponding to 1/30 cc of lymph, could, in two days, produce disease in calves weighing 200 kg. Therefore one cannot exclude the possibility that the activity of the lymph is due to an agent that can multiply... The smallest known bacterium is Pfeiffer's influenza bacillus which is 0.5 to 1.0 microns in length. If the hypothetical agent of foot-and-mouth disease was 1/10 or even 1/5 this size, it would be beyond the resolving power of our microscopes, even with the best immersion systems. This simple consideration would explain our failure to demonstrate the agent in the lymph under the microscope.”

Friedrich Löffler e Paul Frosch, 1897

The so-called fathers of virology, investigating the foot-and-mouth disease virus

Este trabalho é dedicado...

Aos meus pais amados, Marilene e Carlos, por toda dedicação, força, esforço e torcida para eu alcançar meus objetivos. Além do grande amor, sempre presente, e de todos os exemplos de sinceridade e humildade nas suas ações.

Ao meu grande colaborador José, por todo companheirismo, estímulo, humor, confiança, carinho, amizade e amor; pelos conselhos e ajuda dedicada; por estar sempre ao meu lado em todos os momentos; e por me mostrar o lado belo da pesquisa e a importância na percepção do verdadeiro significado dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Cláudio Wageck Canal, pelo exemplo profissional, pela oportunidade, incentivo, ensinamentos, orientação, e confiança depositada em mim desde a iniciação científica.

Ao meu co-orientador, Professor Luís Gustavo Corbellini, pelas oportunidades de novos conhecimentos junto ao seu grupo, paciência, dicas valiosas, e principalmente, pelo incentivo e força.

Aos Professores David Barcellos e David Driemeier, pelas sugestões e correções, por toda disponibilidade e ajuda, e importante participação técnica e científica neste trabalho. Ao Professor David Barcellos, em especial, por ter motivado as primeiras hipóteses e o “nascimento” deste trabalho.

Aos Professores do Centro de Biotecnologia, Carlos Termignoni, Jorge Guimarães e Itabajara da Silva, pelas sugestões, oportunidades, apoio técnico e disponibilização do uso dos seus laboratórios para execução dos experimentos.

À Professora Ana Paula Ravazzolo, pelas valiosas sugestões, pela convivência e disponibilização do uso do seu laboratório e de seus materiais para execução de parte deste trabalho.

Ao Dr. Nilo Ikuta e à Simbios Biotecnologia pela disponibilidade e auxílio técnico.

Aos integrantes da comissão avaliadora, doutores Amauri Alfieri, Rejane Schaefer e Carla Bonan, pelo aceite do convite e revisão da dissertação.

A todos os colegas e professores dos laboratórios de Virologia (Favet), Bioquímica Farmacológica (Cbiot), Imunologia e Biologia Molecular (Favet), Epidemiologia (Favet), Micologia (Favet), Medicina Veterinária Preventiva (Favet) e dos setores de Suínos (Favet) e Patologia Veterinária (Favet), pela grande colaboração no trabalho, amizade, convivência e apoio nas atividades que realizei em cada um destes lugares.

Às colegas de laboratório e amigas Carla Rodenbusch e Laura Lopes de Almeida, pessoas especiais e profissionais exemplares, pela grande amizade, pelos momentos de diversão, pelos conselhos e discussões profissionais e pessoais, pela

colaboração nos experimentos, pelo incentivo, e por fazer meu período no mestrado mais agradável.

À aluna de iniciação científica Patrícia Testa, por me ensinar a ensinar, pela troca de experiências e amizade tão divertida.

As amigas Clarissa Vaz e Marisa Macagnan, por seus exemplos profissionais, pelos ensinamentos e incentivos.

À Maria Colet e aos demais funcionários da Pós-Graduação, pela ajuda e atenção.

À Capes, pelos recursos financeiros fornecidos na forma de bolsa de estudos que possibilitaram a realização do mestrado.

À UFRGS e a Faculdade de Veterinária, por oportunizar a construção de minha carreira profissional.

A todos (professores e colegas) que fizeram parte e colaboraram de alguma forma para minha formação.

Às minhas amigas veterinárias, Cláudia, Maria Cecília e Thaís, por sempre me ouvirem e pelos momentos agradáveis de distração.

À minha família, pelo apoio e suporte emocional, confiança, esforço e amor incondicional para que eu pudesse realizar com sucesso meus objetivos; pela torcida e por sempre acreditarem em mim.

Ao José, meu maior colaborador e exemplo profissional e pessoal, pelas discussões e sugestões científicas, amizade, amor, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por fazê-los mais agradáveis e divertidos, pelo grande companheiro de estudos e de vida, e por me incentivar e me auxiliar na execução deste e de tantos outros trabalhos.

A Deus, por todas essas pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida e por tudo que consegui conquistar.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Circovírus suíno tipo 2	18
<i>1.1.1. Histórico</i>	18
<i>1.1.2. Agente etiológico</i>	19
<i>1.1.3. Replicação</i>	22
<i>1.1.4. Aspectos Epidemiológicos</i>	25
<i>1.1.5. Apresentação da doença</i>	26
<i>1.1.6. Patogênese</i>	33
<i>1.1.7. Regulação da expressão gênica e de proteínas celulares pelo PCV2</i>	35
<i>1.1.8. Diagnóstico</i>	36
<i>1.1.9. Controle e prevenção</i>	38
1.2. Sistema vascular	39
<i>1.2.1. Hemostasia</i>	39
<i>1.2.2. Endotélio</i>	43
1.3. Distúrbios vasculares causados por infecções virais de importância veterinária	45
2. OBJETIVOS	48
3. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS	49
<i>3.1. Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells</i>	49
4. DISCUSSÃO & CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS & SÍMBOLOS

ADP	Difosfato de adenosina
ASF	Peste suína africana
BFDV	Vírus da doença da pena e bico dos psitacídeos
CAV	Vírus da anemia infecciosa das galinhas
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (agrupamento de diferenciação)
CHO	Chinese hamster ovary (células de ovário de hamster chinês)
CS-B	Sulfato de condroitina B
CSF	Peste suína clássica
DIC	Coagulação intravascular disseminada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática
f	Fator
GAG	Glicosaminoglicanos
GP	Glicoproteína
hpi	Horas pós-inoculação
HSPG	Proteoglicanos de heparan sulfato
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFA	Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon gama
IHC	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IPX	Imunoperoxidase
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
ORF	Fase aberta de leitura
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Circovírus suíno

PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PCVAD	<i>Porcine circovirus-associated disease</i>
PCVD	<i>Porcine circovirus disease</i>
PDNS	Síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos
PMWS	Síndrome multissistêmica do definhamento suíno
PPV	Parvovírus suíno
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
RF	Formas replicativas intermediárias de fita dupla
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
TF	Fator tissular
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcialmente ativado
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
vWf	Fator de von Willebrand
5-HT	Serotonina
%	Percentual

RESUMO

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus pequeno, sem envelope e com genoma DNA circular de fita simples pertencente ao gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*. O PCV2 está associado a uma síndrome multissistêmica, atualmente denominada de *porcine circovirus-associated disease* (PCVAD) que acomete suínos e causa sérios prejuízos econômicos. Esta doença caracteriza-se por apresentar uma variedade de manifestações clínicas, como diminuição do ganho de peso, distúrbios respiratórios e entéricos, desordens reprodutivas e alta mortalidade. Além disso, PCVAD está fortemente associada a manifestações de dermatite, comprometimento renal e depleção linfóide. Apesar das grandes perdas econômicas e das inúmeras manifestações clínicas, a patogenia e o mecanismo de infectividade do PCV2 ainda não estão totalmente esclarecidos. O objetivo deste trabalho é avaliar a patogenia do PCV2 em suínos naturalmente infectados e em cultivo celular através da caracterização dos efeitos da infecção no sistema vascular. Primeiramente, foi realizada uma investigação para determinar os parâmetros hemostáticos de suínos naturalmente infectados por PCV2. Além disso, avaliou-se, *in vitro*, as alterações nas propriedades hemostáticas em células endoteliais infectadas pelo PCV2. Nossos resultados, mostram que suínos naturalmente infectados pelo PCV2 apresentam um estado protrombótico, demonstrado pela diminuição do tempo de coagulação e dos níveis de fibrinogênio, ativação e consumo plaquetário, aumento na atividade de trombina no plasma, e presença de vasculite nos capilares sanguíneos. *In vitro*, foi demonstrado que as células endoteliais infectadas pelo PCV2 apresentam um fenótipo ativado, caracterizado pelo aumento na atividade procoagulante na superfície celular. Além disso, foi observado que o

tratamento com trombina exógena nos cultivos celulares infectados por PCV2 induz um aumento na carga viral. A partir disso, evidencia-se a participação do endotélio na infecção pelo PCV2, e a capacidade do vírus em modular a hemostasia. O conjunto destes dados permite um melhor entendimento dos fenômenos que ocorrem no hospedeiro durante a infecção pelo PCV2, especialmente no sistema vascular, permitindo uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos da PCVAD e fornecendo novos conhecimentos dos processos envolvendo a interação PCV2-suíno.

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a small non-enveloped virus with a single-strand DNA genome, which belongs to the *Circovirus* genus of the *Circoviridae* family. PCV2 is related to a multisystemic syndrome nowadays called *porcine circovirus-associated disease* (PCVAD), which affects pigs and causes considerable economic losses. The disease is characterized by a variety of clinical manifestations, such as decrease in weight gain, respiratory and enteric disturbance, reproductive disorders and high mortality rates. Apart from this, PCVAD is also associated to dermatitis, renal failure and lymphoid depletion. In spite of the large economic losses and of the numerous clinical manifestations, the pathogenesis and infection mechanism of PCV2 have not been fully clarified. The aim of this study is to evaluate the PCV2 pathogenesis in naturally infected pigs and in cell culture, by characterizing the effects of the infection in the vascular system. Firstly, an investigation aimed at determining the hemostatic parameters in naturally infected pigs was conducted. Also, an *in vitro* evaluation of the hemostatic properties of PCV2-infected endothelial cells was performed. Our results show that pigs naturally infected with PCV2 presented a prothrombotic state manifested as decreased coagulation time and fibrinogen levels, reduced platelet activation and consumption, increased thrombin plasma activity, and as the occurrence of vasculitis in capillary vessels. *In vitro*, it was demonstrated that endothelial cells infected with PCV2 presented an activated phenotype characterized by a higher procoagulant activity on the cell surface. Apart from this, the treatment with exogenous thrombin in PCV2 infected cell cultures induces an increase in viral load. These findings reveal the role played by the endothelium in the PCV2 infection and the capacity of the virus to modulate

hemostasis. Taken together, these results afford to better understand the phenomena taking place in the host during PCV2 infection, namely in the vascular system, shedding new light on the pathogenic mechanisms of PCVAD and on the processes involved in the swine-PCV2 interaction.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus apresentam grande singularidade e complexidade e a virologia, como ciência, tem de considerar estas características e ser capaz de elucidar como isto pode influenciar nos processos infecciosos. Estes organismos infectam a maioria das formas de vida e, como consequência, são capazes de alterar a história e a evolução de seus hospedeiros. A natureza viral exige diferentes métodos de classificação e está constantemente desafiando os virologistas e cientistas em geral a compreenderem e controlarem estes agentes. Por isso, a investigação e a pesquisa em virologia veterinária, como modelo ou como objeto direto de estudo, são importantes para um melhor conhecimento dos agentes virais que acometem tanto os animais quanto os humanos.

O circovírus suíno (PCV) é um exemplo de vírus que apresenta uma natureza muito singular, apesar de ser relativamente pequeno e codificar poucas proteínas. O primeiro PCV identificado era um contaminante não patogênico de células de linhagem celular. No momento em que um segundo tipo (PCV2) foi isolado e demonstrou-se estar associado a uma doença emergente multifatorial em suínos, o PCV tornou-se mais interessante e intrigante à virologia. Outro aspecto que chama atenção na biologia do PCV2 é que, apesar de consistir-se em um vírus não citopático em cultura de células, é capaz de causar alterações celulares *in vitro* e *in vivo* que podem acarretar em diferentes apresentações clínicas. De fato, na infecção pelo PCV2, a patogênese parece ser mais finamente regulada e dependente de diferentes alterações nas propriedades celulares, que podem ser bastante sutis. Eis, talvez, um dos motivos que faça o completo entendimento da patogenia do PCV2 tão complexo.

A infecção pelo PCV2 pode ser associada a diferentes síndromes ou apresentações clínicas, como a síndrome multissistêmica do definhamento suíno e a síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos. No início da década de 90, a ocorrência de doenças associadas ao PCV2 atingiu o mundo inteiro, causando incalculáveis prejuízos econômicos. Apesar de anos de investigação sobre a biologia, infectividade e patogenia do PCV2, muitos pontos-chave no entendimento da infecção por esse vírus ainda não foram respondidos.

1.1. Circovírus suíno tipo 2

1.1.1. Histórico

O circovírus suíno (PCV) foi originalmente identificado em 1974 como um contaminante não citopático de células de linhagem de rim suíno (PK-15) (TISCHER et al., 1974). Porém, somente em 1982, o nome PCV foi proposto (TISCHER et al., 1982), por estar relacionado a um vírus com genoma circular de DNA. Infecções experimentais de PCV isolado de PK-15 não produziram doença em suínos, sendo considerado não patogênico ao suíno (TISCHER et al., 1986; ALLAN et al., 1995). Na década de 90, uma cepa variante de PCV foi associada com uma doença emergente em suínos que ficou conhecida como síndrome multissistêmica do definhamento suíno (PMWS) (CLARK, 1997; HARDING, 1997; ALLAN et al., 1998; ELLIS et al., 1998), a qual demonstrou ser antigênica e geneticamente distinta da cepa de PCV contaminante de PK-15 (HARDING e CLARK, 1997; ALLAN et al., 1998; HAMEL et al., 1998; MOROZOV et al., 1998). Conseqüentemente, para distinguir as duas cepas, o PCV não patogênico foi designado como circovírus suíno tipo 1 (PCV1) e o PCV associado a

PMWS de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (MEEHAN et al., 1998). No Brasil, a PMWS foi diagnosticada primeiramente no Estado de Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2000; 2003).

A partir dos primeiros relatos de PMWS associada ao PCV2, a doença começou a ser relatada em vários países (SEGALÉS et al., 1997; KIUPEL et al., 1998; ALLAN et al., 1999; MADEC et al., 2000; TRUJANO et al., 2001). Além disso, estudos retrospectivos evidenciaram a presença da infecção por PCV2 em suínos antes da década de 90 (MAGAR et al., 2000; WALKER et al., 2000; SANCHEZ et al., 2001; GRIERSON et al., 2004; CIACCI-ZANELLA et al., 2006).

O PCV2 também tem sido associado a outras síndromes e manifestações clínicas, como a síndrome da dermatite e nefropatia dos suínos (PDNS) (ALLAN et al., 2000; SEGALÉS et al., 2004a; CHAE, 2005), falhas reprodutivas (WEST et al., 1999; LADEKJÆR-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001), doenças do complexo respiratório dos suínos (ALLAN et al., 2000; KIM et al., 2003) e síndrome do tremor congênito (STEVENSON et al., 2001). Por isso, as doenças associadas ao PCV2 foram renomeadas como *porcine circovirus disease* (PCVD) na Europa (SEGALÉS et al., 2005) e como *porcine circovirus-associated disease* (PCVAD) pela Sociedade Americana de Veterinários de Suínos em 2006 (OPRIESSNIG et al., 2007).

1.1.2. Agente etiológico

PCV2 pertence ao gênero *Circovirus* da família *Circoviridae*. Essa família também é composta pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) do gênero *Gyrovirus*. Além dos PCVs, este gênero também inclui outros circovírus de animais, tais como o vírus da doença da pena e bico dos psitacídeos (BFDV), circovírus do

ganso, circovírus do canário e o circovírus dos pombos (PRINGLE, 1999). O PCV2 possui vírions pequenos, de aproximadamente 17 nm, não envelopados, de simetria icosaédrica (**Figura 1**) e com genoma de DNA circular fita simples (TISCHER et al., 1982).

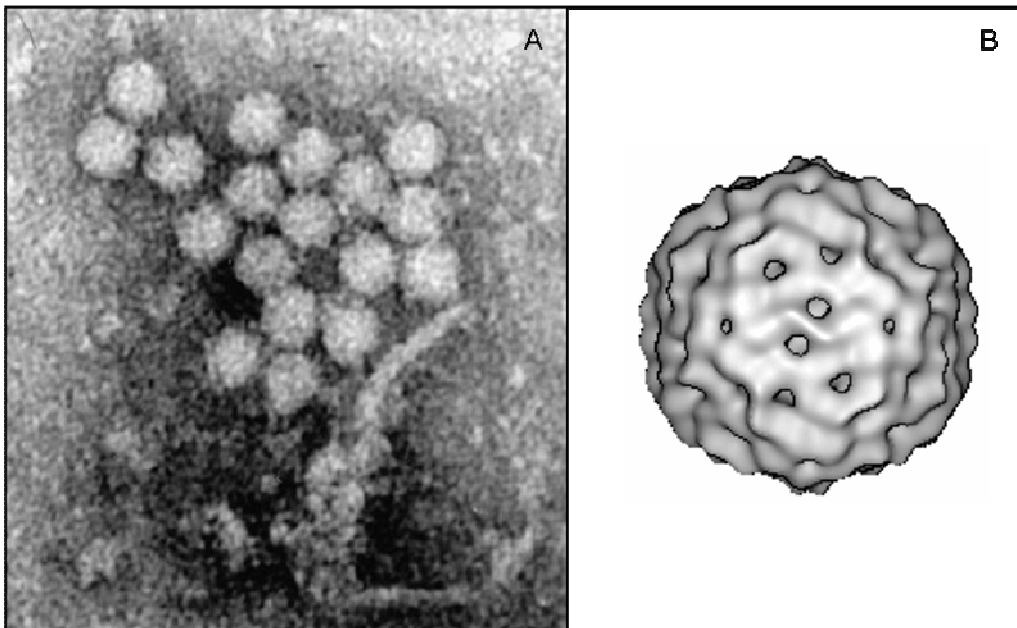


Figura 1: Vírion do PCV2. Painel A, micrografia eletrônica de partículas de PCV2 isoladas de suínos com PCVAD (ALLAN e ELLIS, 2000). Painel B, mapa tridimensional computadorizado do PCV2 (CROWTHER et al., 2003).

No genoma circular do PCV2, que contém de 1767 a 1768 nucleotídeos (MEEHAN et al., 1998), existem seis fases abertas de leitura (ORF) potenciais, mas somente três codificam proteínas já identificadas. A ORF1 codifica duas proteínas essenciais para a replicação, a Rep e a Rep' (CHEUNG, 2003). A proteína Rep possui 312 aminoácidos, sendo a tradução completa da ORF1, enquanto que a Rep' possui 168 aminoácidos e é o produto da clivagem do mRNA transcrito da ORF1. A replicação do DNA viral ocorre somente se ambas as proteínas forem expressas simultaneamente (MANKERTZ et al., 2004). A ORF2 codifica a principal proteína do capsídeo (Cap),

que tem função estrutural, sendo também a molécula mais imunogênica do PCV2 (NAWAGITGUL et al., 2000). Os epítomos imunodominantes da Cap estão localizados nos resíduos de aminoácidos 47 a 84, 165 a 200 e nos últimos quatro aminoácidos da extremidade C-terminal da proteína (LEKCHAROENSUK et al., 2004). Modificações na Cap podem resultar em alterações no tropismo celular e na interação vírus-hospedeiro (NAWAGITGUL et al., 2000; MANKERTZ et al., 2000). A proteína codificada pela ORF3 é expressa predominantemente no núcleo de células e está envolvida no processo de indução de apoptose pela ativação da rota iniciadora caspase-8 e efetora caspase-3 em cultivo celular (LIU et al., 2005). Apesar desta proteína ser considerada não essencial para infecção e replicação do vírus (LIU et al., 2005), já foi demonstrado que suínos inoculados com um mutante PCV2 sem a ORF3 tem menores níveis de viremia e atraso na soroconversão quando comparados com animais inoculados com o vírus selvagem (JUHAN et al., 2010; KARUPPANNAN et al., 2009).

Em um estudo recente, Olvera e colaboradores (2007) propuseram uma subclassificação do PCV2 a partir do sequenciamento de isolados de PCV2 em dois grupos (PCV2 grupo 1 e PCV2 grupo 2). O PCV2 grupo 1 estaria dividido em três *clusters* (1A a 1C), enquanto que o PCV2 grupo 2 pode ser dividido em cinco *clusters* (2A a 2E) (OLVERA et al., 2007). Segundo Opriessnig e colaboradores (2007), simultaneamente a isso, novos termos foram introduzidos para subclassificar o PCV2: isolados *European-like* ou PCV2b (que estariam no PCV2 grupo 1) e isolados *North American-like* ou PCV2a (seriam do PCV2 grupo 2).

No que diz respeito à diversidade genética do vírus, no Brasil já foi verificada a presença desses dois grupos de subclassificação do PCV2 (CIACCI-ZANELLA et al., 2009; CHIARELLI-NETO et al., 2009), além de uma alta variabilidade nas seqüências

existentes do vírus, incluindo seqüências ainda não classificadas. Isto demonstra a grande diversidade genética do PCV2 e indica que a introdução do vírus no País ocorreu mais de uma vez (CHIARELLI-NETO et al., 2009).

1.1.3. Replicação

A ligação do vírus a receptores da superfície celular do hospedeiro é o primeiro passo para a infecção se estabelecer e, na maioria dos casos, determina o tropismo por tecidos e células, e a patogênese. No caso do PCV2, Misinzo e colaboradores (2006) mostraram que o vírus utiliza glicosaminoglicanos (GAG) de superfície, particularmente os proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) e o sulfato de condroitina B (CS-B), como receptores para a ligação em células de linhagem de monócito suíno (3D4/31) e em PK-15. O fato destes GAG estarem presentes na superfície de diversos tipos celulares vai ao encontro da capacidade do PCV2 em infectar uma ampla variedade de células (MISINZO et al., 2006). Além disso, a Cap do PCV2 apresenta um putativo motivo ligador de heparina, que é uma molécula estruturalmente similar ao HSPG (MISINZO et al., 2006), sendo este motivo, provavelmente, o responsável pela interação inicial vírus-célula. Apesar dos GAG estarem envolvidos no primeiro contato do PCV2 com a superfície celular, provavelmente existam outros receptores essenciais ao processo de infecção. Esta hipótese é sustentada pelo fato de que células de linhagem CHO deficientes de GAG ainda podem ser infectadas pelo PCV2, embora em menores níveis (MISINZO et al., 2006).

A infecção viral também requer a entrada do vírus na célula do hospedeiro por penetração direta na membrana plasmática ou, na maioria das vezes, através de uma ou mais rotas de endocitose (DIMITROV, 2004). As rotas de endocitose são usualmente

mediadas por clatrina ou caveolina, macropinocitose, ou independentes de clatrina ou caveolina (SIECZKARSKI e WHITTAKER, 2002). Geralmente, vírus não envelopados são internalizados por endocitose mediada por clatrina ou caveolina (DIMITROV, 2004) e componentes do citoesqueleto, como filamentos de actina, estão envolvidos no transporte intracelular do material internalizado (DURRBACH et al., 1996). Verificou-se que em experimentos de infecção de monócitos suínos (MISINZO et al., 2005), células dendríticas (VINCENT et al., 2005) e epiteliais (MISINZO et al., 2009), a endocitose mediada por clatrina é o mecanismo envolvido no processo de entrada do PCV2, não estando a macropinocitose e a endocitose mediada por caveolina envolvidas nessa internalização (MISINZO et al., 2005; VINCENT et al., 2005). A reorganização da actina e a acidificação endossomal também parecem estar envolvidas na infecção do PCV2 (MISINZO et al., 2005; 2009). Além disso, foi demonstrado que a Cap do PCV2 também interage fortemente com outro componente do citoesqueleto celular, a α -tubulina associada a microtúbulos, o que pode ser importante para a patogenia e replicação do PCV2 (ZHANG et al., 2009).

Após a internalização, a replicação viral ocorre no núcleo e, provavelmente, dependa de proteínas celulares produzidas durante a fase S do ciclo celular (MURPHY et al., 1999). O vírus é dependente da maquinaria de replicação de DNA do hospedeiro, especialmente do uso da DNA polimerase celular (TISCHER et al., 1987; MURPHY et al., 1999). A replicação em vírus de genoma DNA circular fita simples ocorre em três fases (GUTIERREZ, 1999) (**Figura 2**). A primeira fase compreende a conversão do DNA fita simples em formas replicativas intermediárias de fita dupla (RF), sintetizadas a partir da fita molde do genoma do vírus (GUTIERREZ, 1999). Na segunda fase ocorre a amplificação destes RF pelo mecanismo de círculo rolante, possivelmente, sendo

mediado pela replicase Rep, que origina uma estrutura *stem-loop* (MURPHY et al., 1999; BRATANICH e BLANCHETOT, 2002). Durante o período em que o genoma do vírus está na forma de dupla fita é que ocorre a transcrição do RNA mensageiro para produção de proteínas (GUTIERREZ, 1999). A terceira fase consiste na produção e encapsidação do genoma DNA circular fita simples maduro para produção de novas partículas virais (GUTIERREZ, 1999). Nesse sentido, a formação do novo vírion é dependente da interação entre fatores virais e celulares (MANKERTZ et al., 2004; FINSTERBUSCH et al., 2009).

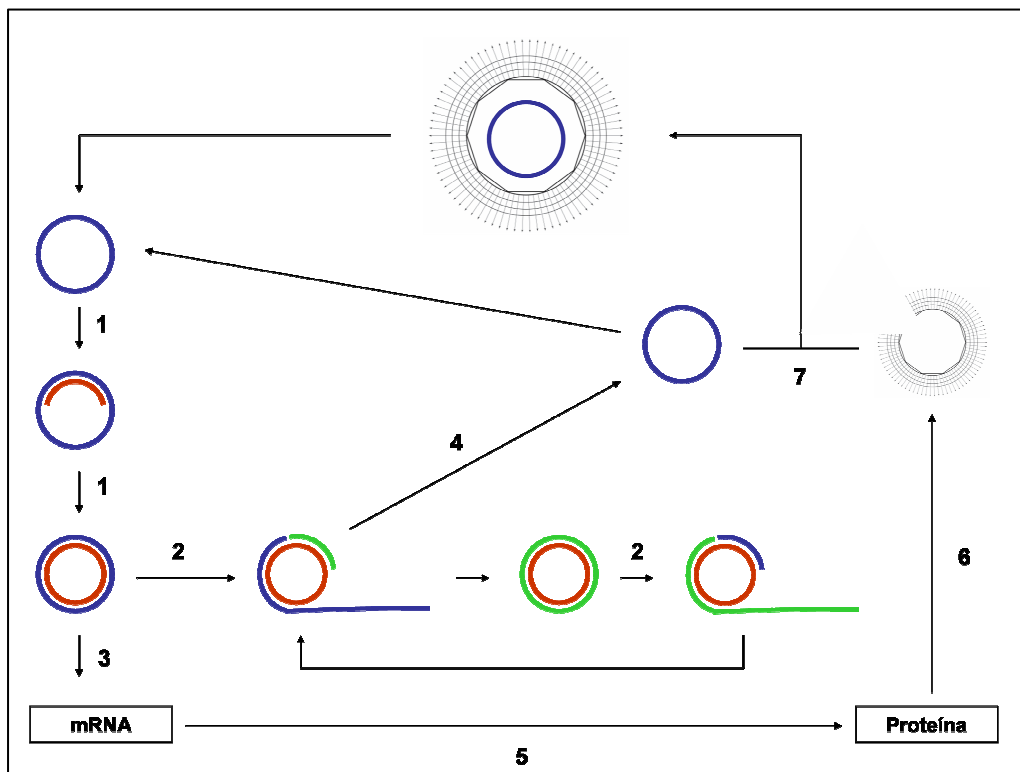


Figura 2: Ciclo de replicação do PCV2. (1) conversão do DNA fita simples em formas replicativas intermediárias de fita dupla (RF); (2) replicação pelo mecanismo de círculo rolante; (3) transcrição; (4) produção do genoma DNA circular fita simples maduro; (5) tradução; (6) formação do capsídeo; (7) encapsidação. Esquema elaborado pela autora, baseado em informações de Gutierrez (1999) e Flores e Kreutz (2007).

Avaliando a cinética de replicação *in vitro* do PCV2, Meerts e colaboradores (2005) observaram que, em células PK-15, a proteína do capsídeo foi expressa entre 6 e 12 horas pós-inoculação (hpi), sendo deslocada para o núcleo entre 12 e 24 hpi, ao mesmo tempo que a proteína Rep era detectada no núcleo. Isso também foi observado em cardiomiócitos fetais e macrófagos alveolares suínos, porém, os antígenos nucleares foram detectados 48 hpi e em uma menor quantidade de células (MEERTS et al., 2005). Neste estudo de Meerts e colaboradores (2005), a produção de vírus foi observada somente em PK-15, o que provavelmente ocorre pelo fato dos cardiomiócitos fetais e macrófagos alveolares suínos estarem em estágio de diferenciação terminal, onde a maquinaria de replicação celular está inativa na maioria das vezes (GILPIN et al. 2003). A replicação do PCV2 também foi avaliada em cultivo de células mononucleares de suínos (YU et al., 2009) e os resultados sugerem que os níveis de replicação não estariam diretamente relacionados à proliferação celular, sendo necessária uma estimulação específica (ativação celular) para seu aumento (YU et al., 2009).

1.1.4. Aspectos Epidemiológicos

O PCV2 é amplamente distribuído na população suína de todo mundo, estando presente tanto nos países onde há PCVAD quanto onde a doença não foi ainda detectada, podendo afetar rebanhos de diferentes tamanhos e em diferentes sistemas de produção (ALLAN e ELLIS, 2000; LAROCHELLE et al., 2003). A soroprevalência do PCV2 é alta, podendo chegar a 100% nos animais de uma mesma granja (LAROCHELLE et al., 2003). Além disso, o PCV2 pode ser detectado no soro do mesmo animal por pelo menos 8 semanas, o que confirma a persistência prolongada de PCV2 em suínos após a infecção natural (LAROCHELLE et al., 2000; LAROCHELLE

et al., 2003). A PCVAD manifesta-se nos leitões a partir da quinta semana de idade (HARDING e CLARK, 1997) e a mortalidade pode chegar a 80% (DARWICH et al., 2004). Em javalis, PCVAD também foi descrita e a detecção de PCV2 confirmou a susceptibilidade dessa espécie à infecção pelo vírus (ELLIS et al., 2003). Em um estudo realizado com rebanhos de javalis, 48% dos animais apresentaram títulos de anticorpos contra PCV2, sendo que o grupo de animais manejados mais intensivamente apresentou maior prevalência de animais com títulos de anticorpos contra o vírus (VICENTE et al., 2004).

A transmissão do PCV2 pode ocorrer de forma horizontal ou vertical, sendo a transmissão horizontal entre suínos mais frequente (SEGALÉS et al., 2005). A transmissão pode ocorrer pelo contato direto via oronasal e pelas rotas fecal e urinária (MAGAR et al., 2000; BOLIN et al., 2001). Segundo Shibata e colaboradores (2003) amostras de suabe nasal, suabe orofaríngeo e fezes de suínos experimentalmente infectados foram positivas na PCR para PCV2 após um dia de inoculação. A transmissão transplacentária foi demonstrada em porcas naturalmente e experimentalmente infectadas (LADEKJÆR-MIKKELSEN et al., 2001; O'CONNOR et al., 2001; JOHNSON et al., 2002). Além disso, o DNA do PCV2 já foi detectado no sêmen de machos infectados (HAMEL et al., 2000; LAROCHELLE et al., 2000), sendo a inseminação artificial uma provável fonte de infecção.

1.1.5. Apresentação da doença

PCVAD é caracterizada pela presença de lesões macro e microscópicas características, associadas com a presença do antígeno de PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2007; GILLESPIE et al., 2009). A infecção pelo PCV2 pode ser subclínica ou

apresentar manifestações clínicas multissistêmicas (SEGALÉS et al., 2004a; OPRIESSNIG et al., 2007), como diminuição do ganho de peso, distúrbios respiratórios e entéricos, desordens reprodutivas e alta mortalidade (DARWICH et al., 2004). Além disso, PCVAD está fortemente associada a manifestações de dermatite necrosante, comprometimento renal (PHANEUF et al., 2007; JOHNSTONE e LAWTON, 2008) e depleção linfóide (SEGALÉS et al., 2004b). A PCVAD acomete, principalmente, animais entre cinco a 16 semanas de idade (HARDING e CLARK, 1997).

A infecção subclínica pelo PCV2 pode estar associada com um decréscimo na eficácia da vacina utilizada contra PCV2 e seu diagnóstico inclui a presença do PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2006a). As lesões causadas na infecção subclínica pelo PCV2 ficam limitadas a um ou dois linfonodos e são, principalmente, caracterizadas por necrose folicular (KIM e CHAE, 2005).

Na PMWS associada ao PCV2, os primeiros sinais incluem perda de peso ou diminuição na taxa de crescimento (**Figura 3**), e palidez ou icterícia (HARDING e CLARK, 1997). Além disso, alguns animais podem apresentar dificuldade respiratória e diarreia (SEGALÉS et al., 2005). As principais lesões ocorrem no tecido linfóide (especialmente nos linfonodos mesentéricos e inguinais), que apresentam aumento de volume e palidez (SEGALÉS et al., 2004a). Microscopicamente, observam-se infiltração de histiócitos e células gigantes no *sinus* subcapsular, retração dos folículos linfóides e depleção linfóide (ROSELL et al., 1999; SEGALÉS et al., 2005; CORRÊA et al., 2006).



Figura 3: Suíno infectado com PCV2. Leitão de 120 dias com retardo de crescimento e apresentação clínica compatível com PMWS (Foto: F. S. Marks).

Na doença respiratória associada ao PCV2, o vírus é responsável por causar uma pneumonia intersticial granulomatosa com bronquiolite ulcerativa e necrosante e fibrose peribronquial (DAFT et al., 1996; SEGALÉS et al., 2004a; DEWEY et al., 2006; SZEREDI e SZENTIRMAI, 2008). Os animais geralmente apresentam piora na conversão alimentar, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia (THACKER, 2001). Em alguns casos de doença respiratória associada ao PCV2, o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) pode estar presente (KIM et al., 2003) e participar potencializando a ação do PCV2 (ALLAN et al., 2000).

Casos de enterite associada ao PCV2 também podem ocorrer e se tornam cada vez mais comuns em suínos infectados pelo vírus. A enterite associada ao PCV2 é uma enterite granulomatosa, onde os animais apresentam diarreia e consequente retardo de crescimento (CHAE, 2005). Além disso, inflamação intestinal granulomatosa, depleção

linfóide na placas de Peyer, presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, infiltrados de células gigantes multinucleadas e células epitelióides são observados no intestino na análise histopatológica (CHAE, 2005).

As desordens reprodutivas associadas ao PCV2 também tem sido relatadas desde os primeiros casos da doença. As principais manifestações clínicas incluem elevação no número de abortos, natimortos, mumificação fetal e mortalidade de leitões pré-desmame (WEST et al., 1999; O'CONNOR et al., 2001; LADEKJÆR-MIKKELSEN et al., 2001; KIM et al., 2004). O principal órgão afetado e com lesões significativas é o coração dos fetos, onde são encontradas extensas áreas de miocardite degenerativa ou necrosante com edema e fibrose leve, além de uma infiltração difusa de linfócitos e macrófagos (WEST et al., 1999; OPRIESSNING et al., 2006b). Além disso, tem sido relatada a presença de uma vasculite crônica no coração, rins e tecidos linfóides fetais (OPRIESSNING et al., 2006b). O PCV2 tem sido associado com falhas reprodutivas em todos os estágios da gestação (SANCHEZ et al., 2001).

Outra apresentação associada ao PCV2 é a PDNS. A PDNS foi primeiramente descrita em 1993 (SMITH et al., 1993), porém, somente foi associada a infecção por PCV2 em 2000 (ROSELL et al., 2000b). Os primeiros sinais são de lesões de pele multifocais (**Figura 4**), de coloração vermelho escura, bem demarcadas, em pequeno relevo e com diâmetro de 1 a 20 mm (CHAE, 2005). Os suínos afetados apresentam anorexia, apatia, severa perda de peso e rigidez muscular e/ou relutância para se movimentar (SEGALÉS et al., 1998; DROLET et al., 1999). Estes suínos morrem rapidamente, sendo a causa da morte relacionada a uma falência renal aguda, com elevação nos níveis séricos de creatinina e uréia (DONE et al., 2001; SEGALÉS et al., 2005). As lesões de pele aparecem primeiramente nos membros posteriores e abdômen,

mas progridem para o tórax, flanco e orelhas (CHAE, 2005). Os rins apresentam-se aumentados e com múltiplos focos de petéquias hemorrágicas na camada cortical (**Figura 5**) (IMAI et al., 2006). Os linfonodos renais e inguinais estão aumentados e avermelhados (RAMOS-VARA et al., 1997). Microscopicamente, as lesões de PDNS são caracterizadas por hemorragias extensas e por uma vasculite necrosante severa presente na derme, pelve renal, mesentério e baço; além de uma glomerulonefrite fibronecrótica e nefrite intersticial (HELIE et al., 1995; THIBAUT et al., 1998; SEGALÉS et al., 2004a; QUEZADA et al., 2004; IMAI et al., 2006). Outras lesões associadas com PDNS são a presença de fluido sero-sanguinolento na cavidade abdominal, pleura, pericárdio e tórax (SEGALÉS et al., 1998; THOMSON et al., 2002) e a presença de microtrombos de fibrina em diversos órgãos (QUEZADA et al., 2004). Suínos com curso prolongado da doença podem apresentar glomerulonefrite crônica e, provavelmente, progredir para dano glomerular permanente (SEGALÉS et al., 1998).



Figura 4: Suíno infectado com PCV2. Leitão com cerca de 90 dias com lesões de pele multifocais disseminadas e apresentação clínica compatível com PDNS (OPRIESSNIG et al., 2007).

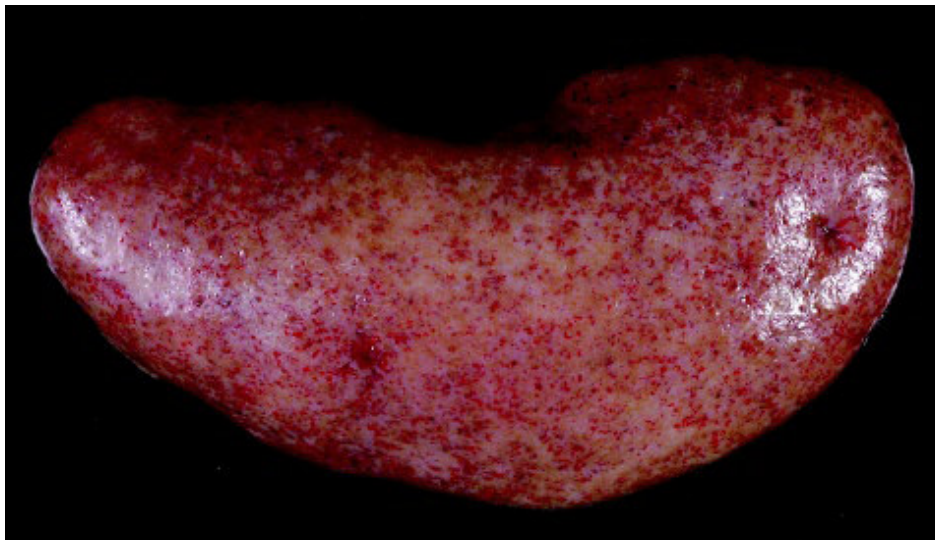


Figura 5: Rim de suíno infectado com PCV2. Rim de suíno infectado por PCV2 apresentando múltiplas petéquias na camada cortical (IMAI et al., 2006).

Algumas lesões no cérebro, como leptomeningite (CLARK et al., 2004), meningoencefalite (ROSELL et al., 1999; CORRÊA et al., 2007) e encefalite (TIBOR, 2004) também têm sido relacionadas a diferentes formas de apresentação da infecção por PCV2. A presença do vírus já foi confirmada em células neuronais, macrófagos e em células endoteliais da meninge, cérebro e cerebelo (STEVENSON et al., 2001; CORRÊA et al., 2007). Outras lesões no sistema nervoso incluem petéquias e múltiplas hemorragias no cérebro e cerebelo (**Figura 6**), vasculite linfocítica necrosante, hipertrofia do endotélio com apoptose de células endoteliais do cérebro e degeneração nos vasos do cerebelo com depósito de fibrina (CORRÊA et al., 2007; SEELIGER et al., 2007). Sinais neurológicos, como ataxia, tremores, opistótono e movimentos de pedalagem, também foram observados em suínos infectados pelo PCV2 (BRUNBORG et al., 2007; CORRÊA et al., 2007) e podem estar relacionados às lesões encontradas no sistema nervoso central.

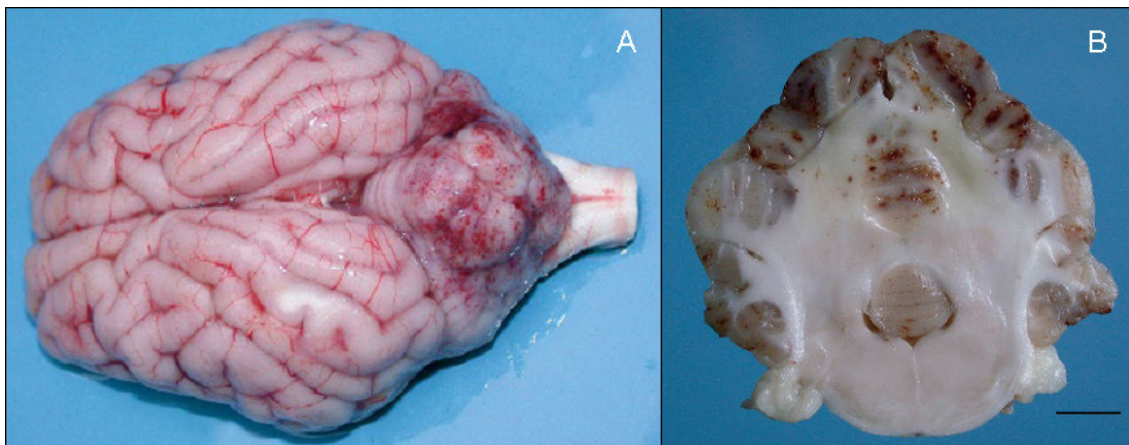


Figura 6: Encéfalo de suíno infectado com PCV2. Painel A, petéquias e múltiplas hemorragias no cérebro e cerebelo de suíno infectado por PCV2. Painel B, hemorragias no córtex cerebelar, corte transversal do cerebelo de suíno infectado por PCV2 (CORRÊA et al., 2007).

Lesões vasculares, como degeneração de células endoteliais e edema intramural, necrose fibrinóide, vasculite, perivasculite e formação de trombos vasculares têm sido observadas em vários órgãos e relacionadas diretamente à presença do PCV2 (CARMAN et al., 2006; OPRIESSNIG et al., 2006b; SZEREDI e SZENTIRMAI, 2008). A presença de petéquias e vasculite associadas com atrofia de linfonodos, falência de órgãos e lesões necróticas e isquêmicas também foram observadas em suínos naturalmente infectados pelo PCV2 (FRANÇA et al., 2005).

1.1.6. Patogênese

Atualmente, a busca mais importante pelos pesquisadores que estudam PCV2 é entender a patogênese da PCVAD. Isto ocorre devido a patogênese da infecção por PCV2 ainda não estar bem caracterizada e permanecer pouco compreendida. Contudo, acredita-se que a imunodepressão, caracterizada pela depleção linfóide e linfopenia, seja um fator determinante no desenvolvimento clínico de PCVAD (SEGALÉS et al., 2004b; OPRIESSNIG et al., 2007). Evidências sustentam a idéia de que nem todos os suínos infectados pelo PCV2 desenvolvem a doença e que a PCVAD tem causas multifatoriais (OPRIESSNIG et al., 2007). Estes fatores são dependentes do vírus, das diferenças entre os isolados, da susceptibilidade do hospedeiro, da modulação do sistema imune e de co-infecções associadas (OPRIESSNIG et al., 2007).

O genoma ou antígenos do PCV2 têm sido detectados no citoplasma de uma grande variedade de tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais (KIUPEL et al., 1999; ROSELL et al., 2000a; GILPIN et al., 2003; VINCENT et al., 2003). Em linfócitos, o PCV2 é detectado somente esporadicamente, não se sabendo se a linfopenia presente nos suínos com

PCVAD é causada pela redução na produção, redução na proliferação ou por necrose ou apoptose induzida pelo vírus (CHIANINI et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2007). Apesar da detecção do PCV2 em monócitos e células dendríticas, não foi observada replicação do vírus nestas células *in vitro* (GILPIN et al., 2003; VINCENT et al., 2003). Isto sugere que estes tipos celulares não representariam o alvo primário para replicação do PCV2, mas poderiam servir como mecanismo de transporte para o vírus no organismo, sendo susceptíveis a modulação viral (McCULLOUGH et al., 2009). Ao receberem um sinal imunomodulador adequado, a liberação e/ou replicação do vírus poderiam ser facilitadas, resultando no acúmulo viral (GILPIN et al., 2003; VINCENT et al., 2003). Como o PCV2 é frequentemente detectado em células epiteliais (ROSELL et al., 2000a), foi sugerido que estas células possam ser o tipo celular primário permissível à replicação do PCV2 (DARWICH et al., 2004).

Após infecção e replicação nas células primárias, acredita-se que o PCV2 seja transportado para os principais alvos (linfonodos e/ou corrente sanguínea), contribuindo para disseminação do vírus pelo organismo (ROSELL et al., 1999). Entretanto, o mecanismo de ocorrência da depleção linfóide com infiltração histiocítica e do decréscimo no número de linfócitos ainda não é conhecido. No estágio posterior da doença, o vírus está presente e, possivelmente, replicando nos órgãos, como rim, intestinos e fígado, podendo causar alterações metabólicas que colaboram para a ocorrência de PMWS (SEGALÉS et al., 2004b). Quanto a PDNS, estudos sugerem que a manifestação é relacionada a um mecanismo de vasculite imuno-mediada (THIBAUT et al., 1998; SEGALÉS et al., 2005; CHAE, 2005) devido à presença de complexos antígeno-anticorpo na superfície dos vasos ou resposta imune celular contra o endotélio (THIBAUT et al., 1998; WELLENBERG et al., 2004)

Infecções experimentais de PCV2 em suínos são capazes de reproduzir uma forma moderada de PCVAD nestes animais (BALASCH et al., 1999; ALBINA et al., 2001; LADEKJAER-MIKKELSEN et al., 2002). Entretanto, quando a infecção por PCV2 é associada a outros agentes infecciosos, como parvovírus suíno (PPV) e PRRSV, a apresentação clínica e as lesões são mais severas (ALLAN e KENNEDY, 1999; ALLAN et al., 2000).

Apesar dessas hipóteses incipientes, ainda existem diversas peças faltando neste “quebra-cabeça”. Porém, a interação vírus-hospedeiro e as mudanças mediadas pelo vírus na célula parecem ser pontos-chave desta investigação.

1.1.7. Regulação da expressão gênica e de proteínas celulares pelo PCV2

Com o objetivo de diminuir as dúvidas existentes acerca da patogênese da infecção por PCV2 e seu papel na PCVAD, vários trabalhos se propuseram a investigar possíveis fatores que estariam envolvidos na geração da doença, fornecendo assim um maior entendimento da interação PCV2-célula hospedeira. Atualmente, estudos de regulação de expressão gênica e de proteômica têm sido empregados para este fim.

Recentemente, dois trabalhos realizaram, através do uso de microarranjos de DNA, a caracterização de potenciais diferenças na expressão gênica durante a infecção por PCV2. Nestes estudos, foram utilizadas amostras de sangue, linfonodos e pulmões de leitões experimentalmente infectados sem apresentação clínica de PCVAD (infecção subclínica). Entre as conclusões destes trabalhos, verificou-se que há um aumento de expressão de genes de quimiocinas, imunoglobulinas, relacionados à ativação de leucócitos, antivirais (da via do IFN- γ) e da via ubiquitina-proteassoma (FERNANDES et al., 2009; TOMÁS et al., 2010). Visto que o PCV2 é um agente imunodepressor, os

autores sugerem que este aumento de expressão de genes relacionados ao sistema imune ocorreria na infecção subclínica. A investigação desta resposta na infecção clínica ainda não está esclarecida. Além disso, constatou-se uma diminuição na expressão de genes de organização celular e do inibidor da via do fator tissular (TFPI) (TOMÁS et al., 2010). Esta redução do TFPI, inibidor fisiológico da ativação da coagulação, pode levar ao aumento da ativação do sistema hemostático, que por sua vez pode estar relacionada com determinados achados patológicos da PCVAD, como a formação de microtrombos e hemorragias.

Analisando o perfil de proteínas diferencialmente expressas em cultura de células PK-15 infectadas por PCV2, foi demonstrado que há aumento das proteínas de citoesqueleto e redução de proteínas envolvidas na biossíntese de macromoléculas. Os resultados também indicam que ocorrem alterações aleatórias em proteínas da via ubiquitina-proteassoma e de metabolismo energético, sugerindo uma desorganização destes processos (ZHANG et al., 2009).

1.1.8. Diagnóstico

O PCV2 está presente na população de suínos em todo mundo e pode ser encontrado tanto em animais doentes como em sadios (ALLAN e ELLIS, 2000). Por isso, a escolha e a interpretação dos testes de diagnóstico são importantes. PCVAD é geralmente diagnosticada pela presença de sinais clínicos e lesões características (SEGALÉS et al., 2005). Ademais, Sorden (2000) propôs uma tríade de achados para definir um caso de PCVAD que auxilia no diagnóstico conclusivo. Nesta tríade está incluída a exigência da presença de sinais clínicos e lesões macroscópicas

características, além da presença do antígeno do PCV2 nos tecidos associados com lesões microscópicas (SORDEN, 2000).

Para detecção do vírus, diferentes técnicas podem ser empregadas, porém a imunohistoquímica (IHC) e hibridização *in situ* (ISH) têm sido os testes mais utilizados (OPRIESSNIG et al., 2007). A ISH, que detecta os ácidos nucléicos do PCV2 e a IHC, que detecta o antígeno viral, podem indicar a localização do PCV2 em amostras de tecidos ou células (ROSELL et al., 1999). Além desses testes, o PCV2 pode ser detectado através da PCR (HAMEL et al., 2000; SHIBATA et al., 2003), imunofluorescência (IFA) (ALLAN et al., 1999; McNEILLY et al., 2001) e microscopia eletrônica (OPRIESSNIG et al., 2007). Para quantificação do número de cópias do genoma do PCV2 no tecido ou soro, foi padronizado um protocolo de PCR em tempo real e o limiar de 10^7 cópias do genoma viral/mL de soro foi sugerido para correlacionar com a presença da PCVAD (OLVERA et al., 2004). O isolamento viral pode ser realizado em células de linhagem (rim ou testículo suíno), porém, como o PCV2 não produz efeito citopático, a detecção de antígenos virais por IFA, imunoperoxidase (IPX) ou PCR é necessária (CIACCI-ZANELLA, 2007).

A detecção de anticorpos tem sido mais utilizada para determinar o tempo de infecção em uma população, para monitoramento de estudos experimentais ou para investigações epidemiológicas (SEGALÉS et al., 2005); e pode ser realizada através de testes imunoenzimáticos (ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática - ELISA), imunofluorescência indireta, ou IPX indireta (WALKER et al., 2000; LAROCHELLE et al., 2003; McNAIR et al., 2004).

1.1.9. Controle e prevenção

Vacinas têm sido utilizadas para o controle da PCVAD e têm se mostrado eficazes na redução de sinais clínicos, na diminuição da viremia e no aumento do ganho de peso diário (KIXMOLLER et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2008). Atualmente, as vacinas disponíveis no mercado mundial e no Brasil são quatro: uma contendo o vírus PCV1-2 quimérico inativado (Suvaxyn PCV2 one dose®, Fort Dodge), uma com o PCV2 inativado (Circovac®, Merial) e duas utilizando a proteína recombinante da ORF2 do PCV2 expressa em baculovírus (Circumvent®, Intervet e CircoFLEX®, Boehringer Ingelheim). A vacinação das fêmeas confere proteção para PCVAD através da transferência passiva de anticorpos para os leitões (OPRIESSNIG et al., 2008)

Medidas de manejo, como redução do nível de estresse no rebanho, melhora na higiene, divisão dos animais por faixa etária, limitação do contato entre os animais, uso do sistema “todos dentro-todos fora” e de vazio sanitário, aumento da qualidade do ar e isolamento dos animais doentes, têm se mostrado importantes na redução da ocorrência de PCVAD (MADEC et al., 2008). A desinfecção do ambiente pode ser uma medida auxiliar na tentativa de redução da pressão infectante, uma vez que a carga do PCV2 diminui quando o ambiente é tratado com produtos à base de amônia quaternária, agentes oxidantes e álcalis (MARTIN et al., 2008).

Além disso, o controle de outras doenças e manejo relacionado a uma boa nutrição, com ingestão de colostro nas primeiras horas de vida e qualidade na alimentação dos suínos também são recomendados (MADEC & WADDILOVE, 2002). Para prevenção da entrada do PCV2 em rebanhos livres, medidas de biossegurança devem ser adotadas, incluindo controle de visitantes, veículos e acesso de outros

animais; e cuidados na introdução de suínos na granja e no uso de sêmen para inseminação artificial (ALLAN e ELLIS, 2000; MADEC et al., 2008).

1.2. Sistema vascular

1.2.1. Hemostasia

Desde 1964, o funcionamento da hemostasia tem sido baseado no modelo da cascata da coagulação sanguínea (MacFARLANE, 1964). Essa cascata de acontecimentos podia ser separada em três vias: a via intrínseca, que recebe este nome por ser ativada por fatores presentes no plasma, e é iniciada pela ativação do sistema contato (fator XII e pré-calicreína); a via extrínseca, que é desencadeada pelo fator tissular (TF) que é um componente extravascular; e a via comum, que inicia após ativação do fator X pelas vias anteriores, que em associação ao fator V e co-fatores realiza a conversão de protrombina em trombina (ou fator IIa). A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo (MacFARLANE, 1964). Esse modelo de coagulação foi muito importante para a compreensão inicial dos fenômenos relacionados a hemostasia e dos testes laboratoriais de avaliação da coagulação, como o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativado (TTPa), que correspondem a via extrínseca e intrínseca, respectivamente (SILVA e HASHIMOTO, 2006). Entretanto, atualmente, esse modelo não é mais adequado para o estudo da hemostasia *in vivo*, onde, células que expressam TF em sua superfície, plaquetas, células endoteliais e outros componentes fisiológicos estão envolvidos na coagulação de uma forma dinâmica (HOFFMAN e MONROE, 2001). Nesse sentido, um novo modelo foi sugerido com o objetivo de permitir uma maior compreensão do

papel dos componentes celulares e das vias da hemostasia *in vivo* (**Figura 7**) (HOFFMAN e MONROE, 2001).

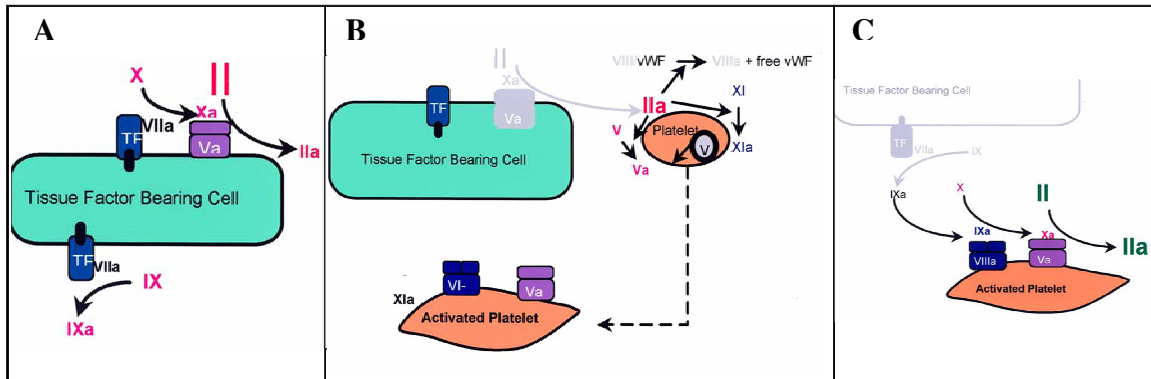


Figura 7: Modelo de hemostasia baseado em células. Painel A, fase de iniciação. Painel B, fase de amplificação. Painel C, fase de propagação (VELDMAN et al., 2003).

Hoffman e Monroe (2001) propõem que a hemostasia ocorre em três fases: iniciação, amplificação e propagação. A fase de iniciação é desencadeada pelo TF, o iniciador da coagulação, e ocorre na superfície de células que expressem TF (como fibroblastos e células epiteliais), que somente entram em contato com a circulação sanguínea em casos de lesões e/ou situações patológicas. Outros tipos celulares como os monócitos e as células endoteliais não expressam TF na superfície celular em situações fisiológicas, contudo, determinados estímulos (geralmente patológicos) podem induzir a expressão de TF, e com isso estas células também podem iniciar o processo de coagulação. Ao entrar em contato com o TF, o fator VII do plasma liga-se fortemente a ele e é rapidamente auto-ativado. O complexo fVIIa/TF ativa tanto o fator X quanto o fator IX em pequena escala. O fator Xa pode ativar o fator V do plasma, e o complexo Xa/Va, por sua vez, é responsável pela formação, a partir da protrombina, de pequenas quantidades de trombina.

Na fase de amplificação, o processo de coagulação passa a ocorrer também na superfície das plaquetas. As plaquetas são estruturas derivadas do citoplasma de megacariócitos e apresentam-se como uma pequena estrutura discóide (SILVA e HASHIMOTO, 2006). As plaquetas exercem função importante na hemostasia pela ocorrência dos fenômenos de adesão, de ativação/secreção e de agregação plaquetária (SILVA e HASHIMOTO, 2006). A adesão plaquetária ocorre quando uma lesão vascular expõe proteínas da matriz subendotelial, principalmente o colágeno, ao contato com o sangue periférico. A interação da plaqueta com o subendotélio requer a participação do fator de von Willebrand (vWF), que se liga ao colágeno exposto e a receptores da plaqueta. Em resposta a diferentes estímulos (agonistas) as plaquetas se ativam e mudam de seu formato característico para uma forma globular rica em pseudópodos. Essa ativação é seguida da secreção do conteúdo dos grânulos plaquetários, que liberam mediadores responsáveis pela ativação de novas plaquetas, e posterior agregação (KROLL e SULLIVAN, 1998). Os principais agonistas plaquetários são: trombina, colágeno, difosfato de adenosina (ADP), ácido aracdônico, tromboxano A₂, fator de ativação plaquetária (PAF), epinefrina e serotonina (5-HT). A agregação plaquetária é o processo de união das plaquetas via pseudópodos, dependente de cálcio e fibrinogênio, o qual faz uma ponte entre os receptores (GPIIb/IIIa) localizados na extremidade do pseudópodo (SILVA e HASHIMOTO, 2006).

Quando ocorre a aderência das plaquetas na matriz extravascular, a pequena quantidade de trombina gerada na fase anterior amplifica o estímulo procoagulante através da ativação inicial das plaquetas e dos fatores V, VIII e XI, que são acumulados na superfície plaquetária. Em resumo, a trombina vai ao mesmo tempo, (i) liberar o fator V dos grânulos da plaqueta, que é ativado pela própria trombina ou pelo fator Xa;

(ii) clivar o complexo vWF/fator VIII para formação de fVIIIa e vWF livre; e (iii) ativar o fator XI. Por sua vez, os fatores Va, VIIIa e XIa ligam-se à superfície da plaqueta.

A fase de propagação caracteriza-se pela grande geração de trombina através da atividade de complexos procoagulantes e de ativação plaquetária massiva. A ação do fator XIa, presente na superfície da plaqueta, leva a conversão de fator IX do plasma em fIXa, que juntamente com fIXa gerado previamente pela ação do complexo VIIa/TF, chegam a superfície da plaqueta formando com o fVIIIa o complexo tenase (fVIIIa/fIXa), que é responsável pela formação de fator Xa em grandes quantidades. O fator Xa forma um complexo com o fator Va (complexo protrombinase), que está ligado na superfície da plaqueta. Quando o complexo protrombinase é formado, a geração de trombina, a partir de protrombina, ocorre em larga escala. Essa quantidade produzida é suficiente para permitir a conversão enzimática do fibrinogênio em fibrina e, assim, a formação do coágulo.

A trombina que desempenha um papel chave na coagulação é uma serinoprotease sintetizada, principalmente, no fígado e sua produção adequada nos locais de lesão vascular é determinante no controle de sangramento (SIMMONDS e LANE, 1998). Em certos quadros patológicos, o excesso de produção de trombina pode contribuir para a hipercoagulação do sangue e modulação de outros fenômenos como inflamação, proliferação celular, resposta imune e ativação dos sistemas contato e complemento (VERGNOLLE et al., 1999; GANDOSSO et al., 2000; AMARA et al., 2008; BLAT e SEIFFERT, 2008; RAMACHANDRAN e HOLLENBERG, 2008).

1.2.2. Endotélio

As células endoteliais estão presentes em todas as partes e órgãos do organismo animal realizando uma interposição estratégica entre o sangue e os tecidos. Inicialmente, as células endoteliais eram consideradas células relativamente inertes na superfície da vasculatura, porém, atualmente, sabe-se que desempenham um papel crucial na regulação da coagulação, adesão plaquetária, tônus vascular, homeostase de fluidos, cicatrização, infiltração tecidual de leucócitos, produção de citocinas e apresentação de antígenos (BEHLING-KELLY e CZUPRYNSKI, 2007). Em condições fisiológicas, o endotélio mantém funções anti-inflamatórias, anti-coagulantes e anti-trombóticas (AIRD, 2004). Este estado anti-trombótico é mantido pela presença, na superfície celular, de proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) que agem repelindo moléculas e células negativamente carregadas, além de potencializarem a ação da antitrombina (MAKRIDES e RYAN, 1998). Além disso, participam ativamente desse processo: o inibidor da via do fator tissular (TFPI), principal inibidor fisiológico da ativação de coagulação desencadeada por TF; o complexo trombomodulina-proteína C-proteína S, que reverte a ação protrombótica da trombina em anti-trombótica e inibe outros fatores na cascata de coagulação; a prostaciclina, o óxido nítrico e as NTPDases, que inibem a agregação plaquetária; e o ativador tecidual do plasminogênio, que atua na degradação do coágulo de fibrina (fibrinólise) (MAKRIDES e RYAN, 1998; BEHLING-KELLY e CZUPRYNSKI, 2007). Em algumas situações patológicas, como inflamações, lesões vasculares, choque e algumas infecções, o endotélio é ativado e os fatores que mantêm seu estado anti-trombótico deixam de ser secretados e expressos na membrana da célula endotelial (GIBBONS, 1998). Ademais, moléculas procoagulantes são expostas ou secretadas na superfície celular, como o TF, iniciador da coagulação;

fosfolípidios de fosfatidilserina, que facilitam a adesão dos fatores envolvidos na hemostasia na superfície celular; inibidores do ativador do plasminogênio (PAI); e citocinas procoagulantes, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (GIBBONS, 1998; BEHLING-KELLY e CZUPRYNSKI, 2007). O endotélio ativado amplifica o estímulo inflamatório que, por sua vez, origina mais células endoteliais ativadas (GIBBONS, 1998). Esta situação tem particular importância na patogênese de inflamações sistêmicas severas, sepse e vasculite (GIBBONS, 1998).

De fato, a ativação endotelial, além de gerar um fenótipo protrombótico, também pode levar a um estado proinflamatório, principalmente, devido ao endotélio mediar os processos de adesão e migração dos leucócitos para os tecidos (McEVER, 1998). O processo de migração leucocitária é iniciado pela marginação e rolamento (“rolling”) dos leucócitos sobre o endotélio mediado pela expressão de P-selectina (CD62P) e E-selectina (CD62E) nas células endoteliais ativadas (TEDDER et al., 1995). Em um segundo momento, moléculas de adesão que promovem a aderência dos leucócitos a parede do vaso sanguíneo, como a molécula de adesão intercelular (ICAM-1 ou CD54) e a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1 ou CD106), são induzidas pela ativação celular e também são expressas na superfície do endotélio (McEVER, 1998). Após a adesão dos leucócitos, a migração transendotelial é iniciada e diversas moléculas envolvidas na integridade vascular participam deste processo, como as proteínas de “*tight junctions*” e de junções de aderência (McEVER, 1998).

1.3. Distúrbios vasculares causados por infecções virais de importância veterinária

Tem sido descrito que diversos agentes virais tem suas manifestações clínicas relacionadas a distúrbios vasculares (BEHLING-KELLY e CZUPRYNSKI, 2007). Isto pode estar diretamente associado ao fato destes agentes virais apresentarem tropismo pelo endotélio (FRIEDMAN et al., 1981; HO et al., 1984; VISSEREN et al., 2000; VALLÉE et al., 2001), sendo que mesmo os vírus que não tem tropismo por células endoteliais, mas causam infecções sistêmicas, também interagem com o endotélio, pelo menos no processo de invasão dos tecidos (TYLER e NATHANSON, 2001).

Um exemplo de agente viral associado a distúrbios vasculares é o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) que, assim como o PCV2, pertence à família *Circoviridae*. A doença causada pelo CAV acomete principalmente aves jovens e é caracterizada por anemia aplástica e atrofia linfóide generalizada com imunodepressão concomitante (YUASA et al., 1979). Os principais sinais clínicos encontrados são depressão, anorexia, palidez de crista e barbela, retardo no crescimento e baixa conversão alimentar (McNULTY, 1991). A doença causada pelo CAV é multifatorial e uma das formas de apresentação pode ser associada a uma síndrome hemorrágica em galinhas (TANIGUCHI et al., 1982). Embriões experimentalmente infectados podem apresentar nanismo e morte por hemorragia sistêmica severa (LAMICHHANE et al., 1991). Esta síndrome hemorrágica tem sido relacionada com o quadro de pancitopenia e, conseqüentemente, trombocitopenia (ADAIR, 2000). Apesar da infecção pelo CAV levar ao decréscimo de trombócitos, não se sabe como isso pode estar relacionado à manifestação da doença, pois não há relatos consistentes sobre o grau de trombocitopenia causado e, ainda é discutida a função exata dos trombócitos na

hemostasia das aves (MILLER e SCHAT, 2004). Outro membro da família *Circoviridae*, o circovírus causador da doença da pena e bico dos psitacídeos (BFDV) também tem sido relacionado a distúrbios vasculares. A doença é caracterizada por uma apresentação crônica associada a diversas anormalidades nas penas, deformidades no bico e, eventualmente, morte em psitacídeos (RAHAUS e WOLFF, 2003). As lesões encontradas incluem necrose de epiderme e trombose e hemorragia do bulbo da pena (PASS e PERRY, 1984), porém a patogênese da doença não é esclarecida. Estes mesmos achados já foram encontrados associados à infecção pelo circovírus dos pombos (WOODS et al., 1994).

Outras infecções sistêmicas causadas por vírus de importância veterinária, especialmente na suinocultura, que também podem causar distúrbios vasculares, são a peste suína africana (ASF) e a peste suína clássica (CSF). A ASF é causada por um arbovírus DNA de fita dupla pertencente à família *Asfarviridae* (PATON e GREISER-WILKE, 2003). Já o agente etiológico da CSF é um pestivírus RNA de fita simples e de polaridade positiva da família *Flaviviridae* (TULMAN et al., 2009). Estas duas viroses são altamente contagiosas e letais para suínos de todas as idades e apresentam quadro clínico e patológico muito semelhante entre si. O Brasil é declarado livre de ASF e a CSF somente ocorre na forma de surtos epizooticos (LYRA et al., 2006; ROEHE et al., 2007). A manifestação clínica destas duas doenças está relacionada à presença de hemorragias e trombozes generalizadas, depleção linfóide, falência múltipla de órgãos, aborto e distúrbios neurológicos (PATON e GREISER-WILKE, 2003; TULMAN et al., 2009). Além disso, dano ao endotélio vascular é observado, o que pode contribuir para as alterações na hemostasia. Estudos sugerem que as manifestações clínicas vasculares podem ser associadas a um quadro de coagulação intravascular disseminada (DIC)

(HEENE et al., 1971; VILLEDADA et al., 1993). A ocorrência de DIC possivelmente é desencadeada pela infecção de células endoteliais pelos vírus da ASF ou CSF, que induzem a expressão de TF (VALLÉE et al., 2001; BENSUAUDE et al., 2004) e, conseqüente, ativação da coagulação (HEENE et al., 1971; VILLEDADA et al., 1993), trombocitopenia e ativação plaquetária intravascular (BAUTISTA et al., 2002; MOZOS et al., 2003).

Também são exemplos de vírus causadores de distúrbios hemostáticos, o vírus da hepatite infecciosa canina (WIGTON et al., 1976), da peritonite infecciosa felina (WEISS et al., 1980), da Maedi-Visna (LENA et al., 1994), da anemia infecciosa equina (CRAWFORD et al., 1996), da diarreia viral bovina (WALZ et al., 2001), da doença da língua azul dos ruminantes (DeMAULA et al., 2002), da doença de Gumboro (LIMA et al., 2005) e da influenza aviária de alta patogenicidade (MURAMOTO et al., 2006). De maneira geral, as alterações no sistema hemostático que podem acarretar distúrbios vasculares devido a infecções virais em animais estão relacionadas principalmente a (i) inibição de anticoagulantes naturais, (ii) indução do estado procoagulante no endotélio vascular, (iii) alterações dos vasos sanguíneos pela indução de inflamação, e (iv) ativação direta de fatores da coagulação (HAJJAR e NICHOLSON, 1997; SUTHERLAND et al., 1997).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a patogenia do PCV2 em suínos naturalmente infectados e em cultivo celular através da caracterização dos efeitos da infecção no sistema vascular.

Objetivos específicos:

- Determinar o papel do sistema vascular na patogênese da infecção por PCV2.
- Determinar se há alteração nos parâmetros de coagulação de suínos naturalmente infectados por PCV2.
- Determinar se há alterações quantitativas e qualitativas nas plaquetas de suínos naturalmente infectados por PCV2.
- Determinar se há ocorrência de vasculite e presença de PCV2 no endotélio concomitantes as alterações hemostáticas em suínos naturalmente infectados por PCV2.
- Avaliar se o PCV2 é capaz de interagir com células endoteliais *in vitro* e modular sua função hemostática.
- Avaliar se a trombina influencia na infecção do PCV2 em células endoteliais *in vitro*.

3. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS

Nesta seção será descrito o trabalho experimental da dissertação, organizado sob a forma de um artigo científico elaborado durante o período de execução do mestrado.

3.1. Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells

Artigo publicado no periódico *Veterinary Microbiology* (v.141, p.22–30, 2010).



Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells

Fernanda S. Marks^a, José Reck Jr.^b, Laura L. Almeida^a, Markus Berger^b,
André M.R. Corrêa^c, David Driemeier^c, David E.S.N. Barcellos^d,
Jorge A. Guimarães^b, Carlos Termignoni^{b,e}, Cláudio W. Canal^{a,*}

^a Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2009

Received in revised form 24 July 2009

Accepted 3 August 2009

Keywords:

Porcine circovirus type 2
Swine virus
Coagulation
Hemostasis
Endothelium
Viral pathogenesis

ABSTRACT

Porcine circovirus 2 (PCV2) is the primary causative agent of porcine circovirus disease (PCVD). PCVD is an emerging disease that has been reported worldwide, associated with wasting, lymphoid depletion, enteritis, pneumonia, vasculitis, ischemic lesions, and necrotizing dermatitis. Although PCVD causes considerable economic losses, the pathogenesis of PCV2 has not been fully understood. The aim of the present work was to study the participation of hemostatic system and of vascular endothelium in PCV2 infection, as well as their possible role in PCVD pathogenesis. Our results showed that naturally PCV2-infected swine displayed a prothrombotic state *in vivo*, since a diminished coagulation time (recalcification time, activated partial thromboplastin time and prothrombin time), a higher platelet aggregation ability (despite a diminished platelet blood count), and an increased thrombin plasma activity (associated with a reduced fibrinogen level) were observed. The PCV2-infected animals showed vasculitis and positive staining for PCV2 antigen in capillary vessels. Furthermore, PCV2-infected endothelial cells displayed an activated phenotype, characterized by an increase in cell surface procoagulant activity. Moreover, the PCV2-infected endothelial cells pre-treated with exogenous thrombin displayed an increased viral load. This work reports, for the first time, the role of the hemostatic system and of endothelium in the pathogenesis and infectivity of PCV2. The study reinforces the importance of the phenomena which occur during PCV2 infection, and affords a better knowledge of the mechanisms behind the pathophysiology of PCVD.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The porcine circovirus type 2 (PCV2) is a small non-enveloped single-strand DNA virus that belongs to the *Circoviridae* family, *Circovirus* genus (Tischer et al., 1982).

PCV2 is the primary agent of porcine circovirus disease (PCVD) in domestic pigs. PCVD is an endemic disease in most countries in which large-scale pig production is an economic activity, and causes high economic losses (Chae, 2004). PCVD usually affects animals between 5 and 16 weeks of age (Hajjar and Nicholson, 1997) and exhibits multisystemic clinical manifestations (Segalés et al., 2004b; Opriessnig et al., 2007) like lessened weight gain, respiratory signs, reproductive disorders, enteric signs and

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 6926; fax: +55 51 3308 7305.
E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C.W. Canal).

high mortality rates (for a good review see Opriessnig et al., 2007). Apart from this, PCVD can be associated with necrotizing dermatitis, renal failure (Phaneuf et al., 2007) and lymphoid depletion (Segalés et al., 2004a). In spite of the considerable economic losses and innumerable clinical manifestations, the pathogenesis and infection mechanism of PCV2 have not been fully established.

Recent research, based mostly on histological observations, highlighted vascular disorders in PCVD infection. It has been suggested that these disorders are involved in the clinical manifestations of PCVD. Some evidence of this relationship has been described by França et al. (2005) in a PCVD outbreak in southern Brazil, in which affected animals presented blood hypercoagulation, petechiae and vasculitis associated to lymph node atrophy, organ failure, as well as ischemic and necrotic lesions. In addition, other findings have been reported, such as widespread petechiae in kidneys (Imai et al., 2006); brain hemorrhage associated with mononuclear vasculitis, endothelium hypertrophy, and fibrin deposition (Corrêa et al., 2006); necrotizing vasculitis accompanied by apoptosis of brain endothelial cells (Seeliger et al., 2007); microvascular thrombosis in kidneys and mesentery, as well as surface hemorrhage (Quezada et al., 2004). Also, Szeredi and Szentirmai (2008) revealed the presence of PCV2 antigen in lymphatic and blood vessels that exhibited severe degeneration of endothelial cells as well as marked formation of thrombi and vasculitis as associated to the occurrence of organ ischemia and necrosis.

The aim of the present study was to investigate the changes in the hemostatic system of swine naturally infected with PCV2, the endothelium participation in PCV2 infection, and possible role these alterations play in PCVD pathogenesis and viral infectivity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and inclusion criteria

Two groups of swine (PCV2 and control) were utilized in this work. All animals had an average age of 120 days and were non-vaccinated against PCV2. The eligibility criteria were: (i) serum samples negative for pestivirus and parvovirus by PCR analysis (following the protocols by Vilcek et al., 1994; Soares et al., 1999, respectively); (ii) lung samples negative for *Mycoplasma* spp. and influenza A virus by PCR analysis (as described by van Kuppeveld et al., 1992; Poddar, 2002, respectively); (iii) negative immunohistochemistry staining for pestivirus and for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens (according to the protocol established by Corrêa et al., 2007) in lung and brain sections; (iv) no bacterial growth in blood culture—the standard procedure to exclude systemic bacterial infections (sepsis) during viral infections (Lange et al., 1985; van Gorp et al., 2001). In addition, it is important to note that according to the Office International des Epizooties (OIE), at present Brazil is a location free of PRRSV and African swine fever virus, and the state of Rio Grande do Sul is free of Aujeszky's disease virus. The inclusion criteria for the PCV2 group also requires that swine fulfill all requisites of triad of findings for the case definition of PCVD proposed by Steven Sorden (2000): presence of clinical signs

(wasting, lessened weight gain, diarrhea), characteristic lesions (lymph node atrophy with lymphoid depletion and histiocytic replacement of follicles in lymphoid tissues, dermatitis and vasculitis, and pale kidney with diffuse cortical white foci), and presence of PCV2 antigen by immunohistochemistry associated with microscopic lesions. Additionally, to be included in the PCV2 group the swine had to be positive for PCV2 by PCR detection (performed as described below). The PCV2 group consisted of 24 swine from two commercial pig farms (located in the municipalities of Lajeado and Arroio do Meio, state of Rio Grande do Sul, Brazil). All animals included in control group ($n = 12$) were from the experimental pig farm of Faculdade de Veterinária, UFRGS, and displayed none of the Steven Sorden's case definition findings, being also negative for PCV2 by PCR detection (performed as described below).

2.2. Samples

Blood samples were collected by jugular vein puncture using sodium citrate 3.2% as anticoagulant (1:10, v/v). Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) were obtained as previously described (Reck et al., 2009). After blood sample collections, the animals were euthanized, necropsied and had the organs removed and placed in buffered formaldehyde 10%. Kidneys of swine from the PCV2 group were aseptically collected and immediately processed for virus isolation.

2.3. DNA extraction

Total DNA from plasma samples, collected from animals and from supernatants of cell cultures, was extracted using size-fractionated silica particles according to a previously described protocol (Boom et al., 1990).

2.4. Polymerase chain reaction (PCR)

The presence of PCV2 was investigated by PCR assay using specific primers that amplify a 263-bp fragment from the open reading frame 2 (ORF 2) of PCV2 (Larochelle et al., 1999).

2.5. Quantitative real-time PCR (qPCR)

TaqMan™ qPCR was conducted according to a protocol described before (Olvera et al., 2004), using the ABI Prism 7300 detection system and sequence detection software (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). The quantification was expressed as virus copies.

2.6. Primary cell culture and virus isolation

To prepare and isolate the virus, primary cultures were prepared from kidneys of swine from the PCV2 group as previously established (Freshney, 2000). The organs were minced into small pieces, washed and digested with 0.25% trypsin. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (200 U/mL) and streptomycin (200 µg/L), and maintained at 37 °C to enable the formation of a

confluent monolayer. Subcultures were performed and the presence of the virus was confirmed by PCR and quantified by *qPCR*. The supernatant obtained from these cell cultures was used as viral inoculum in the cell surface procoagulant assay and in the experiments conducted to investigate the effect of thrombin on viral replication.

2.7. Cell cultures

The cell strain EAhy926 is a human derived endothelial cell, which conserves the main characteristics of natural endothelium (Edgell et al., 1983). The cells were cultivated in DMEM containing 10% FCS, penicillin (200 U/mL) and streptomycin (200 µg/L) supplemented with 100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin and 10 µM thymidine (HAT) at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.8. Coagulation parameters

Recalcification time (RT) was conducted as previously described (Reck et al., 2009). Activated partial thromboplastin time (aPTT) was conducted using the kit Ellagico (Wiener Lab, Rosario, Argentina) and prothrombin time (PT) was carried out according to the instructions of the kit Solusplatin (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Fibrinogen concentration was assessed as formerly described (Reck et al., 2009). Fibrinogen values were expressed as g/L. All assays were conducted using a microplate spectrophotometer (Spectra-Max, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA).

2.9. Platelets

Platelet function was analyzed following the *in vitro* photometric method in an optical aggregometer (Reck et al., 2009) (Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA). Platelet aggregation was induced in PRP using 10 µM adenosine diphosphate (ADP) or 3 µM bovine collagen type I. Platelet aggregation in swine of the control group was considered to be 100%. Blood platelet counts were determined using hemocytometer, and the results were expressed in number of platelets/mL.

2.10. Thrombin activity

A chromogenic assay was conducted using a microplate spectrophotometer to determine plasmatic thrombin activity. The PPP of PCV2 or control groups were pre-incubated with 20 mM Tris–HCl pH 7.4 for 10 min at 37 °C. After, the synthetic chromogenic substrate S-2238 (HD-Phe-Pip-Arg-pNA) (Chromogenix, Mölndal, Sweden) was added to a 0.2 mM final concentration. Next, a kinetic assay was conducted (405 nm) for 40 min, at 14-s reading intervals. The results were expressed as mM/min of substrate hydrolysis.

2.11. Histopathological and immunohistochemistry analyses

Histopathological investigation consisted of the hematoxylin–eosin standard staining in thin sections of organs of swine embedded in paraffin blocks. To identify the viral agent in the lesion site, sections of the organs presenting

pathological changes underwent immunohistochemistry analysis using the anti-PCV2 polyclonal antibody (Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Ames, IA, USA) diluted to 1:1000, using the streptavidin–biotin–peroxidase complex technique (Dako-Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA), and revealed using diaminobenzidine (DakoCytomation Inc, Carpinteria, CA, USA) (Corrêa et al., 2007).

2.12. Cell surface procoagulant assay

Procoagulant activity was measured on the surface of EAhy926 endothelial cells using the cell surface procoagulant assay (Visseren et al., 2000; Reck et al., *in press*). The EAhy926 cells were seeded on 96-well microplates at 4×10^4 cells/well. After a 24-h incubation period at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere, the culture medium was discarded and the cells were inoculated with 50 µL of the PCV2 viral inoculum (2.7 log₁₀ virus copies), 50 µL DMEM without FCS, or 150 µg/mL lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma–Aldrich, Saint Louis, LO, USA). After 1 h, DMEM (3% FCS) was added. After 72 h, the culture medium of all wells was removed and cells washed three times with PBS, whereupon they were incubated in 100 µL Michaelis buffer (28.5 mM sodium acetate, 28.5 mM sodium barbital, 50 mM NaCl, 33 mM CaCl₂, pH 7.35) at 37 °C for 60 s. When this step was finished, 100 µL of pooled human plasma was added to the cells. Endothelium-induced plasma coagulation was assessed in a microplate spectrophotometer. For comparison of results, the LPS group was considered as having 100% procoagulant activity. The results are the mean of six independent experiments.

2.13. Assessment of the effect of thrombin on PCV2 replication in EAhy926 cells by *qPCR*

To assess the effect thrombin may exert on PCV2 replication in endothelial cells, four different treatments were conducted in EAhy926 cells: (i) DMEM without FCS (control group); (ii) PCV2 viral inoculum (2.7 log₁₀ virus copies); (iii) PCV2 viral inoculum (2.7 log₁₀ virus copies) and 20 nM thrombin; and (iv) PCV2 viral inoculum (2.7 log₁₀ virus copies) and 100 nM thrombin. Human thrombin from plasma of healthy donors was purified following a protocol previously described (Ngai and Chang, 1991). The EAhy926 cells were seeded on 96-well microplates at 4×10^4 cells/well, and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After 24 h, the treatments were performed and the cells were incubated for 1 h. Then, the culture medium of all wells was removed; cells were washed three times in PBS and then incubated with DMEM supplemented with 3% FCS. After 72 h of incubation, the cell culture supernatant of each well was collected for total DNA extraction. The extraction product was analyzed by real-time PCR (*qPCR*) to quantify PCV2 DNA. The results are the mean of six independent experiments.

2.14. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± S.E.M. of *n* samples. The statistical analysis of coagulation parameters, thrombin

Table 1
Hemostatic parameters of control and PCV2 group.

Parameters	Control		PCV2	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
RT (s)	157.6	±9.4	76.3 ^{***}	±8.4
aPTT (s)	55.3	±5.8	30.6 ^{**}	±2.6
PT (s)	11.7	±0.6	8.3 ^{**}	±0.35
Fibrinogen (g/L)	4.96	±0.23	3.6 ^{**}	±0.18
Platelets blood count (per mL)	775,400	±93,190	359,000 ^{***}	±30,370
Thrombin activity (mMol/min.)	15.33	±0.91	25.88 ^{***}	±1.3

^{**} $p < 0.01$.

^{***} $p < 0.001$.

activity, platelet count and aggregation were carried out using the Student's *t* test for paired samples. Statistical significance of the cell surface procoagulant assay and of the qPCR data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni or Dunnett *post hoc* tests, respectively. Values of *p* that were under 0.05 were considered statistically different. The statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Coagulation parameters

The results obtained indicated that the infected animals are living under a permanent procoagulant condition. As shown in Table 1, the clotting parameters resulting from RT, aPTT and PT assays reveal that the coagulation times

were significantly diminished in plasma of the PCV2 group, when compared to the control group. In the same line, the plasmatic fibrinogen levels were also significantly lower in animals of the PCV2 group (Table 1).

3.2. Platelet parameters

The data for platelet aggregation indicated that platelets from animals of PCV2 group were circulating in an activated status. This fact can be observed, since platelet aggregation was significantly higher in the PCV2 group as compared to the control group (Fig. 1). Platelet aggregation induced by collagen and ADP in the PCV2 group was around 48% and 40% higher than in the control group, respectively (Fig. 1). It is interesting to note that, in spite of the higher platelet aggregation ability, circulating platelet blood count was expressively lower in the PCV2 group (Table 1).

3.3. Thrombin activity

Thrombin activity in plasma was around 65% higher in the PCV2 group when compared to the mean of the control group (Table 1).

3.4. Histopathological and immunohistochemistry analysis

The histopathological analysis conducted using hematoxylin-eosin staining demonstrated the induction of vasculitis by the PCV2 virus in several blood vessels, as evinced in the mesenteric vasculature of swine from PCV2 group (Fig. 2). Vasculitis was characterized by perivascular

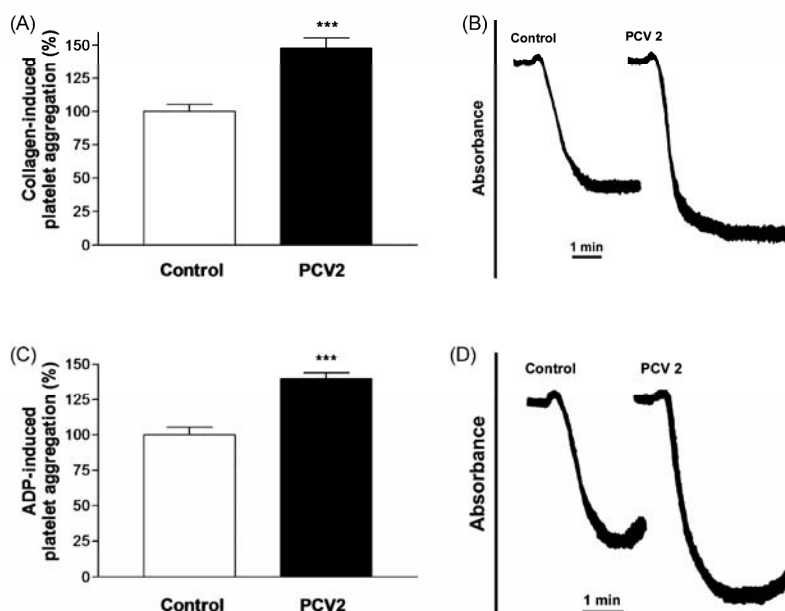


Fig. 1. Platelet function of control and PCV2 group. (A and C) collagen- and ADP-induced platelet aggregation, respectively; each bar represents the mean from 24 animals in the PCV2 group and 12 animals in the control group; vertical lines indicate S.E.M. Statistical analyses were performed using the Student's *t* test for paired samples (^{***} $p < 0.001$). (B and D) represent collagen- and ADP-induced platelet aggregation profile, respectively, of a swine from the control group and other from the PCV2 group.

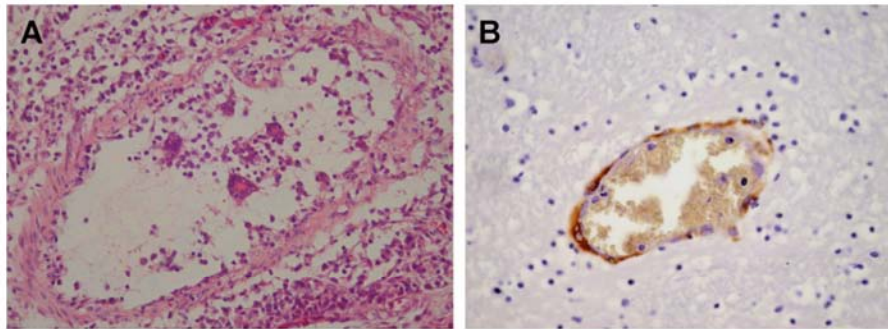


Fig. 2. Histopathological and immunohistochemistry analysis of PCV2 group swine. (A) PCV2 induced vasculitis showing perivascular edema, endothelial cells activation and giant monocytic cells in the lumen of mesenteric vasculature of PCV2-infected piglet. Hematoxylin-eosin stain, 40 \times . (B) PCV2 interaction with endothelium showing the presence of the viral agent at the endothelium of a capillary vessel of the cerebral cortex, by immunohistochemistry, 40 \times .

edema, activation of endothelial cells and giant monocytic cells in the vessel lumen (Fig. 2). Apart from this, a positive anti-PCV2 reaction was observed by immunohistochemistry in the endothelium of capillary vessels from several organs, as evinced in the cerebral cortex (Fig. 2).

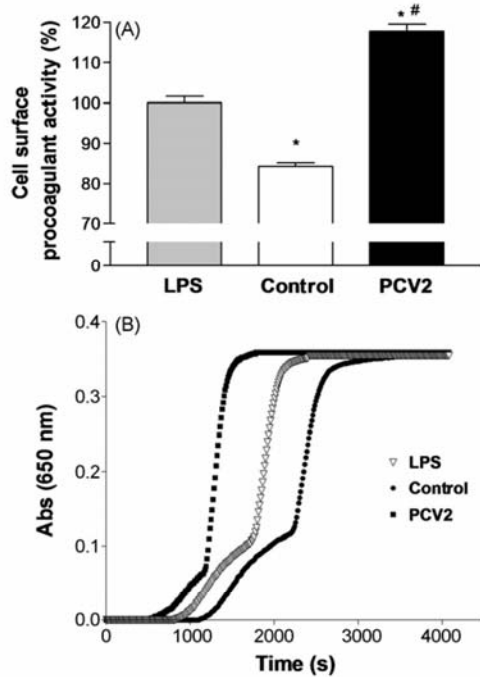


Fig. 3. Cell surface procoagulant activity. Procoagulant activity was measured on the surface of endothelial cell monolayers (EAhy926 cells). (A) Each bar represents the mean from 6 independent experiments, and vertical lines indicate S.E.M. For the sake of data comparison, the value obtained for LPS-treated group was considered as 100% of procoagulant activity. Statistical analyses were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* test corrections (* $p < 0.05$ compared with LPS group; # $p < 0.05$ compared with control group). (B) Representative curves of procoagulant activity from PCV2-infected cells, LPS-treated cells and control.

3.5. Cell surface procoagulant assay

In the light of the fact that PCV2 activates coagulation, induces a higher platelet aggregation and thrombin activity, and that the virus is present in the endothelium, the possibility that the virus was causing these effects through endothelium activation was investigated. Endothelial cells infected with PCV2 displayed a significant increase in the procoagulant activity, when compared to non-infected cells. Control cells presented 84% procoagulant activity and PCV2-infected cells presented 118% procoagulant activity, when cells incubated with LPS were considered as showing 100% procoagulant activity (Fig. 3). It was also observed that the time required for plasma coagulation induced by the endothelium was lower in PCV2-treated cells (Fig. 3).

3.6. Effects of thrombin on PCV2 replication

To assess the effect of thrombin on PCV2 replication in EAhy926 cells, the viral load was quantified by qPCR. The results displayed an increase in viral load of cultures that were treated with thrombin as compared to the infected cells that were not treated, though this increase was significant only when 100 nM thrombin was used (Fig. 4). The mean viral load of PCV2-infected cells was $\approx 30,000$

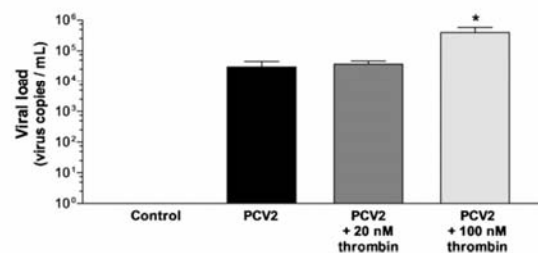


Fig. 4. Effect of thrombin in PCV2-infected EAhy926 cells. The viral load was measured by qPCR. Each bar represents the mean from 6 independent experiments, and vertical lines indicate S.E.M. Statistical analyses were performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett *post hoc* test corrections (* $p < 0.05$ compared with PCV2 group).

virus copies/mL, while in the cells infected and treated with 20 nM and 100 nM thrombin mean viral loads were \approx 63,000 virus copies/mL and 277,600 virus copies/mL, respectively (Fig. 4).

4. Discussion

PCV2 is distributed across the world and is widely present in swine herds (Segalés et al., 2005). PCV2 causes dramatic impacts on swine production, with mortality rates that may reach 80% (Darwich et al., 2004). Although the clinical and pathological changes caused by PCV2 infection have been widely studied, and in spite of the fact that the virus has been associated with a disease that affects different systems changing inflammatory and immune responses, neither PCV2 modulation mechanisms behind these changes nor the role this modulation plays in PCVD pathogenesis have been fully understood.

The present study evaluated *in vivo* the changes in the hemostatic system using blood samples obtained from swine naturally infected with PCV2, the *in vitro* endothelium participation in PCV2 infection, and their possible role in PCVD pathogenesis and viral infectivity. The results obtained revealed that PCV2 infection is able to modulate swine hemostasis. It was observed that plasma coagulation time, measured in the RT, aPTT and PT assays, was diminished in swine from the PCV2 group (Table 1). This diminished coagulation times points to the activation of coagulation in PCV2-infected animals, which occurs also in other several viral systemic infections (González and Notario, 1999). These changes may be related mainly to (i) inhibition of endogenous anticoagulants; (ii) induction of a lastingly procoagulant state in the vascular endothelium; (iii) changes in blood vessels due to the induction of inflammation; and (iv) direct activation of coagulation factors (Hajjar and Nicholson, 1997).

Although fibrinogen is considered an acute-phase protein, it has been shown that its level is lower in PCV2 group (Table 1). This may be related to the fact that these animals presented lower coagulation time, which in turn indicates coagulation activation and therefore a greater consumption of coagulation factors, one of which is fibrinogen. This hypothesis is backed up by the fibrin deposition found on the brain vasculature (Corrêa et al., 2006).

PCV2 group swine also presented lower platelet blood counts, when compared to the control group animals (Table 1). The occurrence of thrombocytopenia is common in viral infections and may be related to the interference in megakaryopoiesis, platelet damage caused by autoimmune responses or by systemic activation of hemostatic processes (González and Notario, 1999). Given the panorama of coagulation activation in PCV2-infected swine, the decrease in platelet blood counts could perhaps be linked to a higher rate of platelet clearance in blood, which in turn is possibly imputable to intravascular platelet activation events, and sequestration events due to microthrombi formation (Kroll and Sullivan, 1998). In order to look into the possibility of platelet activation, platelet aggregation induced by the agonists collagen and ADP was measured. Platelet function was roughly 40%

higher in the PCV2 group than in the control animals (Fig. 1). This activation of hemostasis implies a likely prothrombotic state, in which there is an increase in platelet activation and coagulation, which leads to a greater conversion of prothrombin in thrombin (Kroll and Sullivan, 1998). In turn, this event induces platelet aggregation and activation of other coagulation factors (Kroll and Sullivan, 1998).

In certain pathological scenarios, the excessive thrombin production may contribute to the hypercoagulation of blood and modulation of other phenomena, like inflammation, cell proliferation, immune response and activation of contact and complement systems (Guimarães, 1981). In the present study, thrombin plasma activity was determined and it was observed to be 65% higher in the PCV2 group (Table 1). This fact, associated with previous results demonstrated here, make unequivocally clear that swine infected with PCV2 exhibit an activation state of the hemostatic system. Similar observations have shown an increase in the generation of thrombin in the infection by the herpes simplex virus (HSV) (Visser et al., 1988), and that this increase may play a decisive role in the pathogenesis and in the progression of the disease (Sutherland et al., 2007).

The swine infected with PCV2 may present a wide array of microscopic lesions. In the present study, the animals utilized in the coagulation and platelet function assays were necropsied for the conduction of the histopathological analysis. Fig. 2 shows the presence of inflammation in the mesenteric vasculature, which characterizes vasculitis. This finding agrees with the results of other reports, which detected the same effect in several organs (Segalés et al., 2004b; França et al., 2005; Corrêa et al., 2006; Seeliger et al., 2007). Apart from this, the presence of the PCV2 antigen in the endothelium was confirmed by immunohistochemistry. Positive reaction for PCV2 was observed in the endothelium of several capillary vessels, as in the cerebral cortex (Fig. 2), which affords to link vascular lesions to the presence of the virus in the endothelium.

The occurrence of a procoagulant state in PCV2 naturally infected swine and the presence of the virus in the vascular endothelium indicate that these findings may be related to an activation of the endothelium. Endothelial cells play a crucial role in the regulation of coagulation, platelet adhesion, vascular tonus, fluid homeostasis, wound healing, leukocyte extravasation into tissues, production of cytokines and antigen presentation (for a comprehensive review see Behling-Kelly and Czuprynski, 2007). Under physiological conditions, the endothelium fulfils anti-inflammatory and anti-thrombotic functions (Gibbons, 1998). In the case of vascular inflammation and lesion, like in shock and some types of infection, the endothelium undergoes a phenotypical change known as endothelial activation, an event in which the endothelial anti-thrombotic state changes into a prothrombotic state (Gibbons, 1998). When the endothelium is activated, the factors that maintain the anti-thrombotic state cease to be secreted and/or expressed on the endothelial cell surface. Moreover, procoagulant molecules are secreted or exposed on the cell surface, such as tissue factor (TF, the coagulation initiator), and phosphatidylserine phospholipids (which

facilitate the assembling of the components involved in hemostasis on the cell surface) (Gibbons, 1998; Behling-Kelly and Czuprynski, 2007).

In the present study, endothelial activation was determined on monolayers of EAhy926 cells inoculated with PCV2. The endothelial cells infected with the virus exhibited an increase of roughly 40% in procoagulant activity, when compared to non-infected cells (Fig. 3). In addition, the procoagulant activity on the cell surface induced by PCV2 was higher than that induced by LPS, a well-known inducer of endothelial activation. Other viruses exhibit tropism for endothelial cells and may directly infect endothelial cells and promote their activation, including the influenza virus, respiratory syncytial virus (Visseren et al., 2000), and African swine fever virus (Vallée et al., 2001).

Considering the key role played by thrombin in hemostasis and other physiological processes, linked with the fact that thrombin plasma activity is more expressive in swine with PCVD, with the importance of the endothelium in the PCV2 infection and with the reported viral infections in which coagulation activation and enhanced thrombin activity are associated to an increase in viral infectivity (Sutherland et al., 2007), it became imperative to assess the likely effects thrombin may exert also on PCV2-infected endothelial cells. In the present study, PCV2-infected endothelial cells treated with thrombin presented higher viral loads than non-treated cell cultures (Fig. 4). This points to an evident thrombin role upon viral replication with possible consequences in PCVD.

Thrombin, a multifunctional serine protease, can modulate endothelial cells leading to cell changes in

shape, permeability, DNA synthesis, proliferation, and in protein expression (Minami et al., 2004). As a rule, thrombin action mechanisms in endothelial cells are related to the cell modulation via protease-activated receptor (PAR) (Minami et al., 2004). Thus, the action thrombin exerts on PCV2 infection is probably related to the activation of PARs, as observed in the HSV infection (Sutherland et al., 2007). An elegant report of Sutherland et al. (2007) has shown that HSV induces the production of thrombin that in turn makes endothelial cells more susceptible to HSV by dint of a mechanism that engages PAR-1 activation.

The results of the present study afford to put forward the existence of a mechanism that plays a role, at least partly, in PCVD pathogenesis (Fig. 5). When PCV2 infects swine, the virus comes into contact with the vascular endothelium, thus stimulating endothelial activation and inducing the generation of a procoagulant surface. Endothelium activation brings about the generation of thrombin in plasma, the likely progression of vasculitis, and also favors viral infectivity (Fig. 5). This leads to a procoagulant and prothrombotic state evinced in a decrease in coagulation times, fibrinogen consumption, and platelet activation and consumption (Fig. 5). Other mechanisms, like PCV2 affinity for heparan-sulfate proteoglycans (HSPG), may also be linked to the development of this procoagulant and prothrombotic state, since HSPG is a natural anticoagulant that can be used as a receptor in the attachment of some virus to host cells (Misinzio et al., 2006). This prothrombotic state can be associated to certain PCVD pathological findings, like formation of microthrombi, hemorrhages

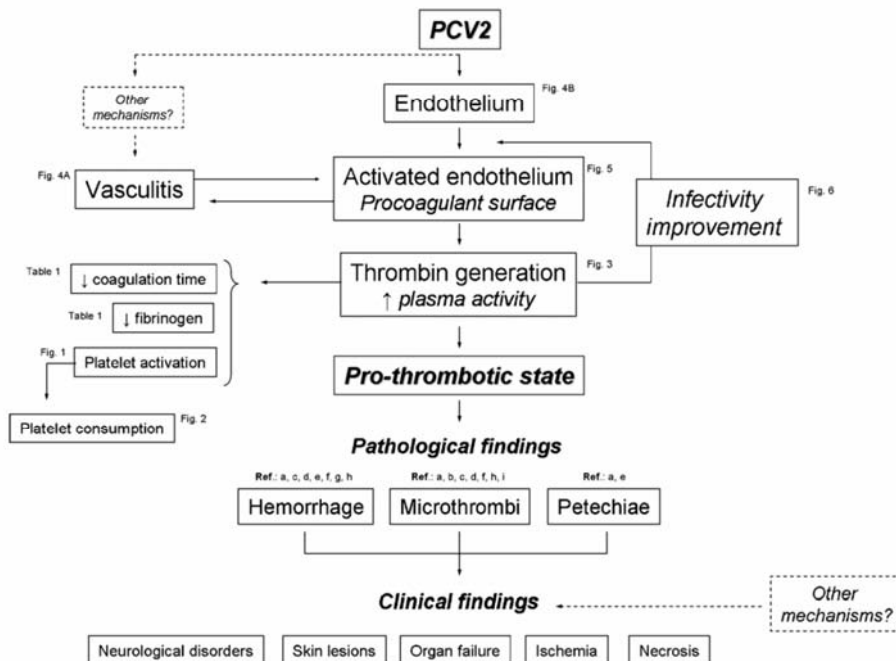


Fig. 5. Schematic representation of the possible involvement of hemostasis and endothelium in PCVD pathogenesis. The characters indicate the following references: (a) Quezada et al. (2004); (b) Segalés et al. (2004b); (c) França et al. (2005); (d) Corrêa et al. (2006); (e) Imai et al. (2006); (f) Corrêa et al. (2007); (g) Opriessnig et al. (2007); (h) Seeliger et al. (2007); (i) Szeredi and Szentirmai (2008).

and petechiae that in turn may lead to clinical manifestations as skin lesions, ischemia, necrosis, neurological disorders and organ failure (Fig. 5). This proposal does not rule out the involvement of other processes in pathogenesis; rather, it underscores the possibility of a synergistic action between different mechanisms.

The present paper reports, for the first time, the role of the hemostatic system and of the vascular endothelium in PCV2 pathogenesis and infectivity. Therefore, this study underlined the importance of understanding the phenomena that occur in infection with PCV2, shedding new light on the pathogenic mechanisms of PCVD and providing up-to-date knowledge on the processes underlying the PCV2–swine interaction.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support. Special thanks to Tatiane Watanabe (Faculdade de Veterinária, UFRGS) for her assistance in the execution of this work. The authors are also indebted to Dr. Fabiana Horn (Departamento de Biofísica, UFRGS) for kindly providing EAhy926 cells, and to Simbios Biotecnologia for the use of real-time PCR facility.

References

- Behling-Kelly, E., Czuprynski, C.J., 2007. Endothelial cells as active participants in veterinary infections and inflammatory disorders. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 47–58.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Chae, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168, 41–49.
- Corrêa, A.M.R., Pescador, C.A., Schmitz, M., Zlotowski, P., Rozza, D.B., Oliveira, E.C., Barcellos, D.E.S.N., Driemeier, D., 2006. Clinical and pathological aspects of swine circovirus in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Braz. J. Vet. Res.* 26, 9–13.
- Corrêa, A.M., Zlotowski, P., Barcellos, D.E.S.N., Cruz, C.E., Driemeier, D., 2007. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 109–112.
- Darwich, L., Segalés, J., Mateu, E., 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.* 149, 857–874.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3734–3737.
- França, T.N., Peixoto, P.V., Brito, M.F., Driemeier, D., Mores, N., Zanella, J., 2005. Outbreak of circovirus (Porcine Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Vet. Res.* 25, 39–53.
- Freshney, R.I., 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*. Wiley-Liss, New York.
- Gibbons, G.H., 1998. The vascular response to injury. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), *Thrombosis and Hemorrhage*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 307–320.
- González, X., Notario, M., 1999. Alteraciones de la hemostasia en las enfermedades virales. *Rev. Cubana Hematol. Immunol. Hemoter.* 15, 21–24.
- Guimarães, J.A., 1981. Conceitos atuais sobre a interação dos sistemas caliceína-cinina, coagulação, renina-angiotensina, complemento e fibrinólise. *Cien. Cult.* 33, 1456–1459.
- Hajjar, D.P., Nicholson, A.C., 1997. Viral activation of coagulation: implications for thrombosis and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 15, 155–165.
- Imai, D.M., Cornish, J., Nordhausen, R., Ellis, J., MacLachlan, N.J., 2006. Renal tubular necrosis and interstitial hemorrhage (“turkey-egg kidney”) in a circovirus-infected Yorkshire cross pig. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 496–499.
- Kroll, M.H., Sullivan, R., 1998. Mechanisms of platelet activation. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), *Thrombosis and Hemorrhage*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 261–293.
- Lange, J.V., Mitchell, S.W., McCormick, J.B., Walker, D.H., Evatt, B.L., Ramsey, R.R., 1985. Kinetic study of platelets and fibrinogen in Lassa virus-infected monkeys and early pathologic events in Mopeia virus-infected monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 999–1007.
- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R., 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80, 69–75.
- Minami, T., Sugiyama, A., Wu, S.Q., Abid, R., Kodama, T., Aird, W.C., 2004. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 41–53.
- Misinzog, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H.J., 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.* 80, 3487–3494.
- Ngai, P.K., Chang, J.Y., 1991. A novel one-step purification of human alpha-thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma. *Biochem. J.* 280, 805–808.
- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J. Virol. Methods* 117, 75–80.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591–615.
- Phaneuf, L.R., Ceccarelli, A., Laing, J.R., Moloo, B., Turner, P.V., 2007. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome associated with porcine circovirus 2 infection in a Yorkshire pig. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46, 68–72.
- Poddar, S.K., 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J. Virol. Methods* 99, 63–70.
- Quezada, M., Ramírez, E., Muñoz, D., Ruiz, A., 2004. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: one of the principal cause of glomerulonephritis in pigs. *Agro-Ciencia* 20, 119–130.
- Reck J. Jr., Berger, M., Marks F.S., Zingali R.B., Canal C.W., Ferreira C.A.S., Guimarães J.A., Termignoni C., in press. Pharmacological action of tick saliva upon hemostasis and the neutralization ability of sera from repeated infested hosts. *Parasitology*.
- Reck Jr., J., Berger, M., Terra, R.M.S., Marks, F.S., da Silva Vaz Jr., I., Guimarães, J.A., Termignoni, C., 2009. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res. Vet. Sci.* 86, 56–62.
- Seeliger, F.A., Brüggemann, M.L., Krüger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segalés, J., Baumgärtner, W., 2007. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Vet. Pathol.* 44, 621–634.
- Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Dominguez, J., Darwich, L., Mateu, E., 2004a. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet. Microbiol.* 98, 151–158.
- Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004b. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet. Microbiol.* 98, 137–149.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
- Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Methods* 78, 191–198.
- Sorden, S.D., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 8, 133–136.
- Sutherland, M.R., Friedman, H.M., Pryzdial, E.L., 2007. Thrombin enhances herpes simplex virus infection of cells involving protease-activated receptor 1. *J. Thromb. Haemost.* 5, 1055–1061.
- Szeredi, L., Szentirmai, C., 2008. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet. Hung.* 56, 101–109.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular singlestranded DNA. *Nature* 295, 64–66.
- Vallée, I., Tait, S.W., Powell, P.P., 2001. African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *J. Virol.* 75, 10372–10382.

- van Gorp, E.C., Minnema, M.C., Suharti, C., Mairuhu, A.T., Brandjes, D.P., ten Cate, H., Hack, C.E., Meijers, J.C., 2001. Activation of coagulation factor XI, without detectable contact activation in dengue haemorrhagic fever. *Br. J. Haematol.* 113, 94–99.
- van Kuppeveld, F.J.M., van der Logt, J.T.M., Angulo, A.F., van Zoest, M.J., Quint, W.G.V., Niesters, H.G.M., Galama, J.M.D., Melchers, W.J.G., 1992. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606–2615.
- Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309–323.
- Visser, M.R., Tracy, P.B., Vercellotti, G.M., Goodman, J.L., White, J.G., Jacob, H.S., 1988. Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8227–8230.
- Visseren, F.L., Bouwman, J.J., Bouter, K.P., Diepersloot, R.J., de Groot, P.H., Erkelens, D.W., 2000. Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thromb. Haemost.* 84, 319–324.

4. DISCUSSÕES & CONCLUSÕES

Os dados deste trabalho evidenciam a participação do sistema vascular na patogênese do PCV2. Os suínos naturalmente infectados, investigados neste trabalho, apresentaram alterações nos parâmetros de coagulação (tempos de coagulação, nível de fibrinogênio e atividade de trombina), na contagem e na função plaquetária. Além disso, estes animais apresentavam um quadro de vasculite associado à presença do PCV2 no endotélio vascular. *In vitro*, o PCV2 foi capaz de interagir com as células endoteliais e induzir um estado procoagulante na superfície celular. Adicionalmente, o PCV2, na presença de trombina foi capaz de atingir uma maior carga viral em células endoteliais infectadas *in vitro*.

O conjunto dos resultados demonstrados neste estudo nos permite sugerir um possível mecanismo que participe, pelo menos em parte, na patogenia da PCVAD. Ao infectar o suíno, o PCV2 entra em contato com o endotélio vascular, estimulando a ativação endotelial e a indução de superfície procoagulante. O endotélio ativado resulta na geração de trombina no plasma, e na possível formação de vasculite. Isso leva a um estado procoagulante e protrombótico, além de favorecer a infectividade viral. Este estado protrombótico está associado a determinados achados patológicos, como formação de microtrombos, hemorragias e petéquias, que, por sua vez, possivelmente podem levar às manifestações clínicas de lesões de pele, necrose, isquemia, alterações neurológicas e falência de órgãos. Cabe ressaltar, que esta hipótese não exclui o envolvimento de outros processos na patogenia da PCVAD.

Este trabalho relata pela primeira vez o papel do sistema vascular, particularmente da hemostasia e do endotélio na patogenia e na infectividade do PCV2.

Estes dados reforçam a importância do entendimento de fenômenos que ocorrem durante a infecção do PCV2 e permitem uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos na PCVAD, fornecendo novos conhecimentos dos processos envolvidos na interação do PCV2 com o suíno.

5. REFERÊNCIAS

- ADAIR, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Dev. Comp. Immunol.**, 24: 247-255, 2000.
- AIRD, W. C. Endothelium as an organ system. **Crit. Care Med.**, 32: S271–S279, 2004.
- ALBINA, E.; TRUONG, C.; HUTET, E.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; L'HOSPITALIER, R.; MAHÉ, D.; ALLÉE, C.; MORVAN, H.; AMENNA, N.; LE DIMNA, M.; MADEC, F.; JESTIN, A. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. **J. Comp. Pathol.**, 125: 292–303, 2001.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J. P.; REILLY, G. A. C.; ADAIR, B. M.; ELLIS, W. A.; McNULTY, M. S. Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Vet. Microbiol.**, 44: 49–64, 1995.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **J. Vet. Diag. Invest.**, 10: 3–10, 1998.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B. M.; KENNEDY, S.; MACKIE, D. P.; ELLIS, J. A.; CLARK, E. G.; ESPUNA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BØTNER, A.; CHARREYRE, C. E. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. **Vet. Microbiol.**, 66: 115–123, 1999.
- ALLAN, G. M. & KENNEDY, S. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.**, 121: 1–11, 1999.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B.; McNAIR, I.; WALKER, I.; KENNEDY, S. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) potentiates PCV2 replication. **Arch. Virol.**, 145: 2421–2429, 2000.
- ALLAN, G. M. & ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **J. Vet. Diag. Invest.**, 12: 3–14, 2000.
- AMARA, U.; RITTIRSCH, D.; FLIERL, M.; BRUCKNER, U.; KLOS, A.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. Interaction between the coagulation and complement system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 632: 71-79, 2008.

- BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZ, A.; PLANA-DURÁN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Comp. Pathol.**, 121: 139–148, 1999.
- BAUTISTA, M. J.; RUIZ-VILLAMOR, E.; SALGUERO, F. J.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Early platelet aggregation as a cause of thrombocytopenia in classical swine fever. **Vet. Pathol.**, 39: 84-91, 2002.
- BEHLING-KELLY, E. & CZUPRYNSKI, C. J. Endothelial cells as active participants in veterinary infections and inflammatory disorders. **Anim. Health Res. Rev.**, 8: 47-58, 2007.
- BENSAUDE, E.; TURNER, J. L.; WAKELEY, P. R.; SWEETMAN, D. A.; PARDIEU, C.; DREW, T. W.; WILEMAN, T.; POWELL P. P. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. **J. Gen. Virol.**, 85: 1029-1037, 2004.
- BLAT, Y. & SEIFFERT, D. A renaissance for the contact system in blood coagulation? **Thromb. Haemost.**, 99: 457-460, 2008.
- BOLIN, S. R.; STOFFREGEN, W. C.; NAYAR, G. P.; HAMEL, A. L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrumdeprived piglets with type 2 porcine circovirus. **J. Vet. Diag. Invest.**, 13: 185–194, 2001.
- BRATANICH, A. C. & BLANCHETOT, A. PCV2 replicase transcripts in infected porcine kidney (PK15) cells. **Virus Genes**, 25: 323-328, 2002.
- BRUNBORG, I. M.; JONASSEN, C. M.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B.; LIUM, B.; KOENEN, F.; SCHÖNHEIT, J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets: A case study. **J. Vet. Diag. Invest.**, 19: 368-375, 2007.
- CARMAN, S.; MCEWN, B.; DELAY, J.; VAN DRUEMEL, T.; LUSIS, P.; CAI, H.; FAIRLES, J. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). **Can. Vet. J.**, 47: 761–762, 2006.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. & MORÉS N. Síndrome multissistêmica do desmamentamento do leitão desmamado (SMDLD) causada pelo circovirus suíno. **Memoria Congr. Mercosur Prod. Porcina**, Buenos Aires, p.16, 2000.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. & MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 55: 522-527, 2003.

- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação de circovirus suino tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, 36: 1480-1485, 2006.
- CIACCI-ZANELLA, J. R. Circoviridae. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Ed. da UFSM, Santa Maria, p.363-374, 2007.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; SIMON, N. L.; PINTO, L. S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L. T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O. A.; ESTEVES, P. A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. **Res. Vet. Sci.**, 87: 157-60, 2009.
- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **Vet. J.**, 169: 326-336, 2005.
- CHEUNG, A. K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. **Virology**, 305: 168–180, 2003.
- CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; DOMÍNGUEZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistological study of the immune system cells in paraffinembedded tissues of conventional pigs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 82: 245–255, 2001.
- CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K. S.; VIDIGAL, P. M.; SILVA, F. M.; CASTRO, L. A.; FIETTO, J. L.; SILVA, A.; ALMEIDA, M. R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. **Virus Res.**, 140: 57-63, 2009.
- CLARK, E. G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Proc. Am. Assoc. Swine Pract.**, 499–501, 1997.
- CLARK, E. G.; ELLIS, J. A.; ALLAN, G. M.; KRAKOWKA, S. Postweaning multi-systemic wasting syndrome in swine. In: Coetzer, J. A. W., Tustin, R. C. **Infectious diseases of livestock**. Oxford University Press, Oxford, p. 1374–1386, 2004.
- CORRÊA, A. M. R.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D. B.; OLIVEIRA, E. C.; BARCELLOS, D. E.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicopatológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, 26: 9-13, 2006.
- CORRÊA, A. M.; ZLOTOWSKI, P.; BARCELLOS, D. E.; CRUZ, C. E.; DRIEMEIER, D. Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Vet. Diag. Invest.**, 19: 109-112, 2007.

- CRAWFORD, T. B.; WARDROP, K. J.; TORNQUIST, S. J.; REILICH, E.; MEYERS, K. M.; MCGUIRE, T. C. A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. **J. Virol.**, 70: 7842-7850, 1996.
- CROWTHER, R. A.; BERRIMAN, J. A.; CURRAN, W. L.; ALLAN, G. M.; TODD, D. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. **J. Virol.**, 77: 13036-13041, 2003.
- DAFT, B.; NORDHAUSEN, R. W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. **Proc. 39th Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.**, AR32, 1996.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. **Arch. Virol.**, 149: 857-874, 2004.
- DeMAULA, C. D.; LEUTENEGGER, C. M.; JUTILA, M. A.; MACLACHLAN, N. J. Bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 86: 147-157, 2002.
- DEWEY, C. E.; JOHNSTON, W. T.; GOULD, L.; WHITING, T. L. Postweaning mortality in Manitoba swine. **Can. J. Vet. Res.**, 70: 161-167, 2006.
- DIMITROV, D. S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. **Nat. Rev. Microbiol.**, 2: 109-122, 2004.
- DONE, S.; GRESHAM, A.; POTTER, R.; CHENNELLS, D. PMWS and PDNS – two recently recognised diseases of pigs in the UK. **In Practice**, 23: 14-21, 2001.
- DROLET, R.; THIBAUT, S.; D'ALLAIRE, S.; THOMSON, J. R.; DONE, S. H. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. **J. Swine Health Prod.**, 7: 283-285, 1999.
- DURRBACH, A.; LOUVARD, D.; COUDRIER, E. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. **J. Cell Sci.**, 109: 457-465, 1996.
- ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can. Vet. J.**, 39: 44-51, 1998.
- ELLIS, J.; SPINATO, M.; YONG, C.; WEST, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. **J. Vet. Diag. Invest.**, 15: 364-368, 2003.

- FERNANDES, L. T.; TOMÁS, A.; BENSAID, A.; PÉREZ-ENCISO, M.; SIBILA, M.; SÁNCHEZ, A.; SEGALÉS, J. Exploratory study on the transcriptional profile of pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. **Anim. Biotechnol.**, 20: 96-109, 2009.
- FINSTERBUSCH, T.; STEINFELDT, T.; DOBERSTEIN, K.; RÖDNER, C.; MANKERTZ, A. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. **Virology**, 386: 122-131, 2009.
- FLORES, E. F.; KREUTZ, L. C. Replicação viral. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Ed. da UFSM, Santa Maria, p.107-135, 2007.
- FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; DRIEMEIER, D.; MORÉS, N.; ZANELLA, J. Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, 25: 39-53, 2005.
- FRIEDMAN, H. M.; MACARAK, E. J.; MACGREGOR, R. R.; WOLFE, J.; KEFALIDES, N. A. Virus infection of endothelial cells. **J. Infect. Dis.**, 143: 266-273, 1981.
- GANDOSSI, E.; LUNVEN, C.; BERRY, C. N. Role of clot-associated (-derived) thrombin in cell proliferation induced by fibrin clots in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, 129: 1021-1027, 2000.
- GIBBONS, G. H. The vascular response to injury. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p.307-320, 1998.
- GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. **J. Vet. Intern. Med.**, 23: 1151-1163, 2009.
- GILPIN, D. F.; MCCULLOUGH, K.; MEEHAN, B. M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; STEVENSON, L. S.; FOSTER, J. C.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 94: 149-161, 2003.
- GRIERSON, S. S.; KING, D. P.; SANDVIK, T.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; DREW, T. W.; BANKS, M. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. **Arch. Virol.**, 149: 1171-1183, 2004.
- GUTIERREZ, C. Geminivirus DNA replication. **Cell Mol. Life Sci.**, 56: 313-329, 1999.
- HAJJAR, D. P. & NICHOLSON, A. C. Viral activation of coagulation: implications for thrombosis and atherosclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 811: 155-165, 1997.

- HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J. Virol.**, 72: 5262–5267, 1998.
- HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G. P. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. **Can. J. Vet. Res.**, 64: 44–52, 2000.
- HARDING, J. C. S. & CLARK, E. G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Swine Health Prod.**, 5: 201–203, 1997.
- HARDING, J. C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome PMWS: Preliminary epidemiology and clinical presentation. **Proc. Am. Assoc. Swine Pract.**, p. 503, 1997.
- HEENE, D.; HOFFMANN-FEZER, G.; HOFFMANN, R.; WEISS, E.; MÜLLER-BERGHAUS, G.; LASCH, H. G. Coagulation disorders in acute hog cholera. **Beitr. Pathol. Bd.**, 144: 259–271, 1971.
- HELIE, P.; DROLET, R.; GERMAIN, M. C.; BOURGAULT, A. Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. **Can. Vet. Journal**, 36: 150–154, 1995.
- HO, D. D.; ROTA, T. R.; HIRSCH, M. S. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 7588-7590, 1984.
- HOFFMAN, M. & MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb. Haemost.**, 85: 958-965, 2001.
- IMAI, D. M.; CORNISH, J.; NORDHAUSEN, R.; ELLIS, J.; MACLACHLAN, N. J.. Renal tubular necrosis and interstitial hemorrhage ("turkey-egg kidney") in a circovirus-infected Yorkshire cross pig. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 18: 496-499, 2006.
- JOHNSON, C. S.; JOO, H. S.; DIREKSIN, K.; YOON, K. J.; CHOI, Y. K. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 14: 507–512, 2002.
- JOHNSTONE, A.C. & LAWTON, D.E. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, 56: 94-99, 2008.
- JUHAN, N. M.; LEROITH, T.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. **Virus Res.**, 147: 60-66, 2010.

- KARUPPANNAN, A. K.; JONG, M. H.; LEE, S. H.; ZHU, Y.; SELVARAJ, M.; LAU, J.; JIA, Q.; KWANG, J. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. **Virology**, 383: 338-347, 2009.
- KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Vet. J.**, 166: 251–256, 2003.
- KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence and detection of porcine circovirus 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Vet. Rec.**, 155: 489-492, 2004.
- KIM, J. & CHAE, C. Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. **Vet. Rec.**, 156: 177–178, 2005.
- KIUPEL, M.; STEVENSON, G. W.; MITTAL, S. K.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M. Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. **Vet. Pathol.**, 35: 303-307, 1998.
- KIUPEL, M.; STEVENSON, G. W.; KANITZ, C. L.; ANOTHAYANONTHA, L.; LATIMER, K. S.; MITTAL, S. K. Cellular localization of porcine circovirus in postweaning pigs with chronic wasting disease. **Eur. J. Vet. Pathol.**, 5: 77–82, 1999.
- KIXMÖLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMÜLLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. **Vaccine**, 26: 3443–3451, 2008.
- KROLL, M. H. & SULLIVAN, R. Mechanisms of platelet activation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 261-291, 1998.
- LADEKJÆR-MIKKELSEN, A. S.; NIELSEN, J.; STORGAARD, T.; BØTNER, A.; ALLAN, G.; MCNEILLY, F. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. **Vet. Rec.**, 148: 759–760, 2001.
- LADEKJÆR-MIKKELSEN, A. S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-weekold piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Vet. Microbiol.**, 89: 97–114, 2002.
- LAMICHHANE, C. M.; SNYDER, D. B.; GOODWIN, M. A.; MENGEL, S. A.; BROWN, J.; DICKSON, T. G. Pathogenicity of CL-1 chicken anemia agent. **Avian Dis.**, 35: 515-522, 1991.
- LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MÜLLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 4629–4632, 2000.

- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can. J. Vet. Res.**, 67: 114–120, 2003.
- LEKCHAROENSUK, P.; MOROZOV, I.; PAUL, S. P.; THANGTHUMNIYOM, N.; WAJJAWALKU, W.; MENG, Z. J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. **J. Virol.**, 78: 8135-8145, 2004.
- LENA, P.; FREYRIA, A. M.; LYON, M.; CADORÉ, J. L.; GUIGUEN, F.; GREENLAND, T.; BELLEVILLE, J.; CORDIER, G.; MORNEX, J. F. Increased expression of tissue factor mRNA and procoagulant activity in ovine lentivirus-infected alveolar macrophages. **Res. Virol.**, 145: 209-214, 1994.
- LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **J. Virol.**, 79: 8262–8274, 2005.
- LIMA, A.; FEHERVARI, T.; PAASCH, L. H.; CALDERÓN, N. L. Haematological and histological findings in Leghorn chickens infected with infectious bursal disease virus strain 73688. **Acta Vet. Hung.**, 53: 501-506, 2005.
- LYRA, T. M. The eradication of African swine fever in Brazil, 1978-1984. **Rev. Sci. Tech.**, 25: 93-103, 2006.
- MacFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, 202: 498-499, 1964.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHE, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Liv. Prod. Sci.**, 63: 223–233, 2000.
- MADEC, F. & WADDILOVE, J. Control of PCV2 or other factors, several approaches to a complex problem. In: **PMWS and PCV2 diseases beyond the debate**. Proceedings of 17th IPVS Congress. Ames, Iowa, USA, p. 45-53, 2002.
- MADEC, F.; ROSE, N.; GRASLAND, B.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. **Trans. Emerg Dis.**, 55: 273-283, 2008.
- MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **J. Comp. Pathol.**, 123: 258–269, 2000.

- MAKRIDES, S. C.; RYAN, U. S. Overview of the endothelium. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 295-306, 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. **Vet. Microbiol.**, 98: 81-88, 2004.
- MANKERTZ, A.; HATTERMANN, K.; EHLERS, B.; SOIKE, D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. **Arch. Virol.**, 145: 2469–2480, 2000.
- MARTIN, H.; LE POTIER, M. F.; MARIS, P. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. **Vet. J.**, 177: 388-393, 2008.
- MCCULLOUGH, K. C.; RUGGLI, N.; SUMMERFIELD, A. Dendritic cells at the front-line of pathogen attack. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 128:7-15, 2009.
- McEVER, R. P. Interactions of leukocytes with de vessel wall. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 307-320, 1998.
- McNAIR, I.; MARSHALL, M.; MCNEILLY, F.; BOTNER, A.; LADEKJAERMIKKELSEN, A. S.; VINCENT, I.; HERRMANN, B.; SANCHEZ, R.; RHODES, C. Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diag. Invest.**, 16: 164–166, 2004.
- McNEILLY, F.; MCNAIR, I.; MACKIE, D. P.; MEEHAN, B. M.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. M. Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. **Arch. Virol.**, 146: 909–922, 2001.
- McNULTY, M. S. Chicken anaemia agent: a review. **Avian Pathol.**, 20: 187-203, 1991.
- MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V.A.; ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M.; ALLAN, G. M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **J. Gen. Virol.**, 79: 2171–2179, 1998.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; MCNEILLY, F.; NAUWYNCK, H. J. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. **Arch. Virol.**, 150: 427–441, 2005.
- MILLER, M. M. & SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host-parasite relationship. **Avian Dis.**, 48: 734-745, 2004.

- MISINZO, G.; MEERTS, P.; BUBLLOT, M.; MAST, J.; WEINGARTL, H. M.; NAUWYNCK, H. J. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. **J. Gen. Virol.**, 86: 2057–2068, 2005.
- MISINZO, G.; DELPUTTE, P. L.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D. J.; NAUWYNCK, H. J. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells, **J. Virol.**, 80: 3487–3494, 2006.
- MISINZO, G.; DELPUTTE, P. L.; LEFEBVRE, D. J.; NAUWYNCK, H. J. Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. **Virus Res.**, 139: 1–9, 2009.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. J.; PAUL, P. S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2535–2541, 1998.
- MOZOS, E.; HERRÁEZ, P.; PÉREZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; BLANCO, A.; MARTÍN, M. P.; JOVER, A. Cutaneous lesions in experimental acute and subacute African swine fever: an immunohistopathological and ultrastructural study. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, 110: 150-154, 2003.
- MURAMOTO, Y.; OZAKI, H.; TAKADA, A.; PARK, C. H.; SUNDEN, Y.; UMEMURA, T.; KAWAOKA, Y.; MATSUDA, H.; KIDA, H. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. **Microbiol. Immunol.**, 50: 73-81, 2006.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3 ed. Academic Press, San Diego, 629p., 1999.
- NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S. R.; HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; PAUL, P. S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **J. Gen. Virol.**, 81: 2281–2287, 2000.
- O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E. G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J. A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Can. Vet. J.**, 42: 551–553, 2001.
- OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **J. Virol. Meth.**, 117: 75–80, 2004.
- OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology**, 357: 175–185, 2007.

- OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 19: 591-615, 2007.
- OPRIESSNIG, T.; MCKEOWN, N. E.; HARMON, K. L.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, 13: 923-929, 2006a.
- OPRIESSNIG, T.; JANKE, B. H.; HALBUR, P. G. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. **J. Comp. Pathol.**, 134: 105-110, 2006b.
- OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; ELSENER, J.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. **Clin. Vaccine Immunol.**, 15: 397-401, 2008.
- PASS, D. A.; PERRY, R. A. The pathology of psittacine beak and feather disease. **Aust. Vet. J.**, 61: 69-74, 1984.
- PATON, D. J. & GREISER-WILKE, I. Classical swine fever - an update. **Res. Vet. Sci.**, 75: 169-178, 2003.
- PHANEUF, L. R.; CECCARELLI, A.; LAING, J. R.; MOLOO, B.; TURNER, P. V. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome associated with porcine circovirus 2 infection in a Yorkshire pig. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, 46: 68-72, 2007.
- PRINGLE, C. R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. **Arch. Virol.**, 144: 2065-2070, 1999.
- QUEZADA, M.; RAMÍREZ, E.; MUÑOZ, D.; RUIZ, A. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: one of the principal cause of glomerulonephritis in pigs, **Agro-Ciencia**, 20: 119-130, 2004.
- RAHAUS, M. & WOLFF, M. H. Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, 50: 368-371, 2003.
- RAMACHANDRAN, R. & HOLLENBERG, M. D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. **Br. J. Pharmacol.**, 153: S263-282, 2008.
- RAMOS-VARA, J. A.; DURAN, O.; RENDER, J. A.; CRAFT, D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. **Vet. Rec.**, 141: 479-480, 1997.

- ROEHE, P.; BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J.; DRIEMEIER, D. Peste suína africana. In: Sobestiansky, J.; Barcellos, D. **Doenças dos suínos**. Cânome editorial, Goiânia, p.293-299, 2007.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and *in-situ* hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **J. Comp. Pathol.**, 120: 59–78, 1999.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. **Vet. Pathol.**, 37: 687–692, 2000a.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J. A.; FOLCH, J. M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; DURAN, C. O.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Vet. Rec.**, 146: 40–43, 2000b.
- SÁNCHEZ, R.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M. Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In: **Proc. of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting**, p. 122, 2001.
- SEELIGER, F. A.; BRÜGMANN, M. L.; KRÜGER, L.; GREISER-WILKE, I.; VERSPOHL, J.; SEGALÉS, J.; BAUMGÄRTNER, W. Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. **Vet. Pathol.**, 44: 621-634, 2007.
- SEGALÉS, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DEL POZO, M.; NOVAL, R.; SACRISTÁN, C.; DE LAS HERAS, A.; FERRO, A.; LATIMER, K. S. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. **Vet. Rec.**, 141: 600–601, 1997.
- SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; ESPUNA, E.; DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **Vet. Rec.**, 142: 483–486, 1998.
- SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbiol.**, 98: 137–149, 2004a.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; DOMÍNGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Vet. Microbiol.**, 98: 151-158, 2004b.
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Anim. Health Res. Rev.**, 6: 119-142, 2005.

- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. **J. Vet. Med. Sci.**, 65: 405–408, 2003.
- SIECZKARSKI, S. B. & WHITTAKER, G. R. Dissecting virus entry via endocytosis. **J. Gen. Virol.**, 83: 1535–1545, 2002.
- SILVA, P. H. & HASHIMOTO, Y. **Coagulação – visão laboratorial da hemostasia primária e secundária**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 136p., 2006.
- SIMMONDS, R. E. & LANE, D. A. Regulation of coagulation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. **Thrombosis and hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 45-76, 1998.
- SMITH, W. J.; THOMSON, J. R.; DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. **Vet. Rec.**, 132: 47, 1993.
- SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, 8: 133–136, 2000.
- STEVENSON, G. W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S. K.; CHOI, J.; LATIMER, K. S.; KANITZ, C. L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 13: 57–62, 2001.
- SUTHERLAND, M. R.; FRIEDMAN, H. M.; PRYZDIAL, E. L. Thrombin enhances herpes simplex virus infection of cells involving protease-activated receptor 1. **J. Thromb. Haemost.**, 5: 1055-1061, 2007.
- SZEREDI, L. & SZENTIRMAI, C. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. **Acta Vet. Hung.**, 56, 101-109, 2008.
- TANIGUCHI, T.; YUASA, N.; MAEDA, M.; HORIUCHI, T. Hematopathological changes in dead and moribund chicks induced by chicken anemia agent. **Natl. Inst. Anim. Health Q.**, 22: 61-69, 1982.
- TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, 9: 866-873, 1995.
- THACKER, E. L. Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? **Pig J.**, 48: 66–70, 2001.

- THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M. C.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. **Vet. Pathol.**, 35: 108–116, 1998.
- THOMSON, J. R.; HIGGINS, R. J.; SMITH, W. J.; DONE, S. H. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). **J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.**, 49: 430-437, 2002
- TIBOR, S. Histopathological lesions observed in disease (postweaning multisystemic wasting syndrome) caused by porcine circovirus type 2 (PCV2) and their diagnostic, pathogenic and clinical evaluation. **Magy Allatorv Lapja**, 126: 465–481, 2004.
- TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, 295: 64–66, 1982.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Arch. Virol.**, 91: 271–276, 1986.
- TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Arch. Virol.**, 96: 39–57, 1987.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A.**, 26: 153–167, 1974.
- TOMÁS, A.; FERNANDES, L. T.; SÁNCHEZ, A.; SEGALÉS, J. Time course differential gene expression in response to porcine circovirus type 2 subclinical infection. **Vet. Res.**, 41: 12, 2010
- TRUJANO, M.; IGLESIAS, G.; SEGALÉS, J.; PALÁCIOS, J. M. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico, **Vet. Rec.**, 148: 792, 2001.
- TULMAN, E. R.; DELHON, G. A.; KU, B. K.; ROCK, D. L. African swine fever virus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 328: 43-87, 2009.
- TYLER, K. L. & NATHANSON, N. Pathogenesis of Viral infections. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M., **Fields Virology**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 199-243, 2001.
- VALLÉE, I.; TAIT, S. W.; POWELL, P. P. African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. **J. Virol.**, 75: 10372-10382, 2001.

- VELDMAN, A.; HOFFMAN, M.; EHRENFORTH, S. New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant factor VIIa. **Curr. Med. Chem.**, 10: 797-811, 2003.
- VERGNOLLE, N.; HOLLENBERG, M. D.; WALLACE, J. L. Pro- and anti-inflammatory actions of thrombin: a distinct role for proteinase-activated receptor-1 (PAR1). **Br. J. Pharmacol.**, 126: 1262-1268, 1999.
- VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HÖFLE, U.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M.; GORTÁZAR, C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Vet. Res.**, 35: 243-253, 2004.
- VILLEDA, C. J.; WILLIAMS, S. M.; WILKINSON, P. J.; VIÑUELA, E. Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). **Arch Virol.**, 130: 71-83, 1993.
- VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B. M.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. C. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. **J. Virol.**, 77: 13288–13300, 2003.
- VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; GUZYLACK-PIRIOU, L.; HERRMANN, B.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. C. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. **Immunology**, 115: 388-398, 2005.
- VISSEREN, F. L.; BOUWMAN, J. J.; BOUTER, K. P.; DIEPERSLOOT, R. J.; DE GROOT, P. H.; ERKELENS, D. W. Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. **Thromb. Haemost.**, 84: 319-324, 2000.
- WALKER, I. W.; KONOBY, C. A.; JEWURST, V. A.; McNAIR, I.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B. M.; COTTRELL, T. S.; ELLIS, J. A.; ALLAN, G. M. Development and application of a competitive enzymelinked immunorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus. **J. Vet. Diag. Invest.**, 12: 400–405, 2000.
- WALZ, P. H.; BELL, T. G.; GROOMS, D. L.; KAISER, L.; MAES, R. K.; BAKER, J. C. Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type I or type II bovine viral diarrhea virus. **Can. J. Vet. Res.**, 65: 241-247, 2001.
- WEISS, R. C.; DODDS, W. J.; SCOTT, F. W. Disseminated intravascular coagulation in experimentally induced feline infectious peritonitis. **Am. J. Vet. Res.**, 41: 663-71, 1980.
- WELLENBERG, G. J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; DE JONG, M. F.; BOERSMA, W. J.; ELBERS, A. R. Excessive porcine circovirus type 2 antibody

titers may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. **Vet. Microbiol.**, 99: 203–214, 2004.

WEST, K. H.; BYSTROM, J. M.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G. M.; HAINES, D. M.; CLARK, E. G.; KRAKOWKA, S.; McNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J. A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 11: 530–532, 1999.

WIGTON, D. H.; KOCIBA, G. J.; HOOVER, E. A. Infectious canine hepatitis: animal model for viral-induced disseminated intravascular coagulation. **Blood**, 47: 287-296, 1976.

WOODS, L. W.; LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. D.; RIDDELL, C.; CROWLEY, A. M.; ANDERSON, M. L.; DAFT, B. M.; MOORE, J. D.; CAMPAGNOLI, R. P.; NORDHAUSEN, R. W. A retrospective study of circovirus infection in pigeons: nine cases (1986-1993). **J. Vet. Diagn. Invest.**, 6: 156-164, 1994.

YU, S.; HALBUR, P. G.; THACKER, E. Effect of porcine circovirus type 2 infection and replication on activated porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 127: 350-356, 2009.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. **Avian Dis.**, 23: 366-385, 1979.

ZHANG, X.; ZHOU, J.; WU, Y.; ZHENG, X.; MA, G.; WANG, Z.; JIN, Y.; HE, J.; YAN, Y. Differential proteome analysis of host cells infected with porcine circovirus type 2. **J. Proteome Res.**, 8: 5111-5119, 2009.