

BRUNO MARQUES TEIXEIRA

**Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência
felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um
abrigos na cidade de São Paulo**

**São Paulo
2010**

BRUNO MARQUES TEIXEIRA

**Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de
amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo**

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2330 FMVZ	Teixeira, Bruno Marques Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo / Bruno Marques Teixeira. -- 2010. 150 f. : il.
	Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.
	Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária.
	Orientador: Profa. Dra. Mitika Kurabayashi Hagiwara.
	1. Vírus da imunodeficiência felina. 2. Caracterização molecular. 3. Análise filogenética. 4. Evolução clínica da infecção. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na Cidade de São Paulo”, protocolado sob o nº1146/2007, utilizando 55 (cinquenta e cinco) gatos, sob responsabilidade da Profa Dra Mitika Kuribayashi Hagiwara, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research “Molecular studies on Feline immunodeficiency virus (FIV) strains isolated in a shelter from São Paulo”, protocol number 1146/2007, utilizing 55 (fifty five) cats, under the responsibility Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TEIXEIRA, Bruno Marques

Título: Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo.

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“A falha não deve ser uma decepção para aqueles que aceitam os desafios mais extremos e não se fixam no que é modestamente proporcional: ela é a régua graduada de nossos empreendimentos e não deve ser referida aos nossos sentimentos, nem usada como prova contra nossa realização, que afinal se compõe incessantemente de mil recomeços.”

(Rainer Maria Rilke)

*“Quero a utopia, quero tudo e mais
quero a felicidade dos olhos de um pai
quero a alegria, muita gente feliz
quero que a justiça reine em meu país*

*Quero a liberdade, quero o vinho e o pão
quero ser amizade, quero amor, prazer
quero nossa cidade sempre ensolarada
os meninos e o povo no poder, eu quero ver*

*São José da Costa Rica, coração civil
me inspire no meu sonho de amor Brasil
se o poeta é o que sonha o que vai ser real
bom sonhar coisas boas que o homem faz
e esperar pelos frutos do quintal*

*Sem polícia, nem a milícia, nem feitiço, cadê poder ?
viva a preguiça viva a malícia que só a gente é que sabe ter
Assim dizendo a minha utopia
eu vou levando a vida, eu viver bem melhor
doido pra ver o meu sonho teimoso, um dia se realizar”*

(Milton Nascimento e Fernando Brant)

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

(João Guimarães Rosa)

DEDICO este trabalho à minha querida família por tornarem meus sonhos, realidade.

À Profa. Mitika pela sábia orientação e
ensinamentos fundamentais à minha formação profissional,
confiança e amizade. Eterno exemplo de comprometimento e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Olhar para trás e lembrar a trajetória percorrida desde o verão de 2006 nos remete a muitos acontecimentos, histórias e pessoas, sem as quais esta pesquisa não seria a mesma. Rever o caminho trilhado suscita um conjunto de sentimentos: a alegria do dever comprido; a saudade precipitada de um período determinante; a expectativa de novos projetos; a gratidão para com aqueles com que compartilhei este momento marcante. Portanto, ao chegar ao final, gostaria de deixar registrado meu agradecimento a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para que esse projeto se tornasse possível.

A minha orientadora, Mitika, meus sinceros agradecimentos pelo acompanhamento e pelo profissionalismo com que trilhou toda esta trajetória.

Aos meus pais, João Gabriel e Márcia, pela base emocional e afetiva que sempre me fortaleceu para seguir em frente, sobretudo diante de novos desafios. Pelo orgulho e alegria com que compartilham comigo as conquistas e o amor e a solidariedade com que me acolhem nos momentos difíceis. Aos meus irmãos, Tiago, André e Núbia, pelo apoio, carinho, amizade, compreensão e exemplos. Se, hoje, concretizo essa pesquisa, devo dividir os méritos desta conquista com vocês que valorizam o direito e o dever de sonhar. Enfim, a toda a minha família alicerce fundamental desta vitória. Tiagão nosso convívio foi gratificante nessa trajetória, muito obrigado pelos bons momentos. Um beijo especial para João, Maria e Mateus, sobrinhos queridos que iluminam a estrada.

A Lila, acalanto desde o nosso primeiro encontro em São Conrado, pela paciência, disponibilidade e carinho. Obrigado por me possibilitar viver um grande amor. Tem nada disso não é isso mesmo !!!

Aos Professores Margaret J. Hosie e Brian J. Wallett, pela paciência e orientação na etapa gelada deste trabalho. Obrigado pela oportunidade.

A excelente equipe do *Retrovirus Research Laboratory* pela orientação, paciência e amizade, em especial à Nicola Logan e Linda McMonagle.

Agradeço a grande e querida amiga Samantha, pela ajuda nas análises bioquímicas e toda parte laboratorial deste experimento, além das conversas, do companheirismo, das risadas, das cervejas, à amizade. Eita Japa gente boa sô!

Sincero agradecimento ao Professor Alan Lane de Melo e todos os membros do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG do ano de 1997, pelas preciosas orientações na minha primeira etapa acadêmica e por apresentar esta minha grande paixão, a pesquisa.

Ao Professor Dr. Jenner K. P. Reis do *Retrolab*, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, que me iniciou nos caminhos da virologia e me apresentou os Retrovírus.

Aos Professores Leonardo José Richtzenhain e Paulo Eduardo Brandão por deixarem as portas sempre abertas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS). Paulo obrigado pelos preciosos auxílios, sugestões e companheirismo, exemplo de comportamento profissional.

À toda equipe do LABMAS especialmente a Sheila pela enorme ajuda e paciência com todos os sequenciamentos do estudo.

Ao Professor Fernando Ferreira, pela amizade e orientação estatística neste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Clínica Médica, por terem contribuído na minha formação docente. Em especial ao Carlos Eduardo Larsson, Archivaldo Reche Junior, Alice M. M. P. Della Libera, Marica Mery Kogika e Sílvia Regina Ricci Lucas, pelas disciplinas específicas e pelas ricas contribuições as quais foram fundamentais para o enriquecimento desta pesquisa e da minha formação.

A todos os membros do grupo de pesquisa da professora Mitika e a todos aqueles que contribuíram na elaboração desta pesquisa. Especialmente, Aline, Andreza, Cíntia, Alexandre, Carlos e Dani, nesta etapa final, pelas fundamentais orientações e contribuições, responsáveis por clarear caminhos.

A todos os funcionários da FMVZ-USP com quem pude conviver durante esse período e que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho. Especialmente à Claudia, Maria Luisa, Marli, Maria Helena, Dona Carmem e Dinha, pela ajuda na parte laboratorial e agradável convívio.

À toda equipe do laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ, especialmente ao Marcelo Bahia Labruna. O convívio durante todo este trabalho foi fundamental. Trabalhar sorrindo é sempre mais agradável.

Ao amigo Ewaldo, pela amizade e solidariedade que balizou nossas relações. E pela oportunidade de dividirmos descobertas, inquietações, discussões, expectativas, angústias e pelo amadurecimento que alcançamos juntos. Muito obrigado por tudo!

Pedro André (Alemão), agradeço pela amizade, pelas risadas, pelo companheirismo, pelas cervejas e pães de queijo, pelas conversas animadas e de crescimento pessoal. Obrigado por me apresentar esta acolhedora cidade. Sampa!

Agradeço o companherismo dos amigos da Paulicéia, Fabiano Carrion, Marquinho, Dal, Jerusa e Alícia, pelos momentos de descontração compartilhados.

Agradeço a todos os colegas de pós graduação, especialmente Milton (Tio Chico), Fernando, Camila, Humberto, Barreto, Carol e João Paulo, pelos já saudosos momentos de convívio. Sentirei falta dos churrascos na Clínica de Ruminantes.

Ao Milton pela preciosa e dolorosa ajuda nas coletas deste trabalho. Você foi um grande, alegre e bravo companheiro neste trabalho. Temos várias histórias para contar...

As secretarias do departamento de clínica médica da FMVZ-USP, Adelaide Borges, Maria Aparecida e Silvana pelo auxílio na parte burocrática dos documentos e condução do doutorado sempre dentro das regras estabelecidas.

As funcionárias da Biblioteca Elsa e Elena, pela colaboração na verificação das normas para publicação e produção da ficha catalográfica desta tese.

A turma do Bairro Ouro Preto, Pampulha, pela forte amizade. Muita conjuminância! Saudades da Serra do Cipó...

Aos veteretas pela eterna polêmica.

A Dona Carmem, proprietária do gatil onde realizado o estudo, pela preocupação em proporcionar conforto aos animais desvalidos, pelo carinho com estes seres abandonados. Demonstra assim um caráter especial, merece o meu mais profundo respeito e agradecimento.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro a este projeto, possibilitando sua realização.

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ – USP pela minha formação e pelo presente trabalho de Doutorado.

Para finalizar, a vida que sempre me concede saúde, forças e determinação para alcançar meus objetivos e aos animais razão de minha escolha profissional.



Belo Horizonte

ALUGA-SE APTO
próximo ao portão 3 da USP
(10 minutos caminhando)

Vista panorâmica para cidade
dois quartos
garagem
porteiros 24H

Contato: 11 84942202
11 87183856



São Paulo



Scotland



Cunha



Tibúrcio

RESUMO

TEIXEIRA, B. M. **Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo.** [Characterization of isolates of FIV from an open shelter in Sao Paulo]. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um lentivirus que infecta gatos domésticos (*Felis catus*), causando uma imunodeficiência progressiva análoga a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana). A ampla heterogeneidade molecular do FIV e a alta capacidade de promover mutações sob pressões imunológicas, farmacológicas ou ambientais são características inerentes aos lentivirus. A identificação do subtipo de vírus e o conhecimento da diversidade genética das cepas circulantes são fundamentais para o desenvolvimento estratégico de vacinas capazes de resultar na imunização do hospedeiro e no estabelecimento de testes diagnósticos. Objetivando isolar o material genético e realizar a caracterização molecular do vírus da imunodeficiência felina foram coletadas e analisadas amostras de sangue periférico de felinos portadores do FIV, co-habitantes de um abrigo aberto de felinos, em São Paulo, SP, em quatro momentos distintos, T0 (zero), no momento inicial da avaliação e seis, dez e quinze meses após a coleta inicial, correspondendo aos momentos T1, T2 e T3, respectivamente. Foram realizados testes hematológicos e bioquímicos nas quatro coletas com a finalidade de avaliar a evolução clínica da infecção. Adicionalmente foi realizado um estudo de variabilidade genética do FIV, com base no sequenciamento dos produtos amplificados dos gene *env* obtidos no estudo. Os envelopes clonados foram utilizados para transfectar células resultando na expressão das proteínas do envelope que possibilitaram estudos com os receptores celulares utilizados pelos isolados brasileiros. As análises das sequências virais mostraram que todas as amostras, do abrigo, pertencem ao subtipo B. Foi observado um baixo percentual de mudança, da região estudada do vírus entre as quatro coletas. O fenômeno de “quasispecies” virais, bastante estudado no HIV, pode ser documentado em nossas amostras. Nos exames hematológicos e bioquímicos; hematócrito, hemoglobina, contagem total de leucócitos, proteína total e gamaglobulinas; dos animais infectados pelo FIV observou-se mudanças entre a primeira e quarta coleta demonstrando assim a importância dos testes utilizados no acompanhamento da infecção pelo FIV. Com relação aos dados com os receptores do FIV, os resultados apontam uma menor complexidade

na interação entre os envelopes dos isolados do estudo com o receptor CD134 para proceder a infecção quando comparados com cepas virulentas do FIV.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência felina (FIV). Caracterização molecular. Análise filogenética. Evolução clínica da infecção.

ABSTRACT

TEIXEIRA, B. M. **Characterization of isolates of FIV from an open shelter in São Paulo.** [Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo]. 2010.150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FIV is an important viral pathogen that infects the domestic cat and causes a slow progressive degeneration of the immune system which eventually leads to a disease comparable to acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in humans. Similar to all retroviruses, FIV has a relatively high evolutionary rate and genomic heterogeneity. The determination of subtype and the knowledge of genetic diversity of the current strains are very important to developing a protective vaccine and for the routine diagnosis of infection. The aim of this study was to isolate and characterize samples of feline immunodeficiency virus from cats from an open shelter in São Paulo, Brazil. All cats infected with FIV from this shelter were sampled on August 26th, 2007 (T_0) and also six (T_1), ten (T_2) and fifteen (T_3) months after the basal sampling (T_0). In each sample, blood was analyzed for the following: complete hematology, clinical chemistry and serum protein electrophoresis. Hematological and clinical chemistry parameters were analyzed to determine laboratory parameters characteristic of disease progression which allow a better description of the chronic phase of the infection. Furthermore, analyses of the variants from each sample were performed in order to estimate the degree of divergence following infection with Brazilian strains. The FIV envelope glycoprotein gene from Brazilian FIV isolates cloned were transfected to investigate the receptor usage. The sequences of all virus of the study belong to subtype B. Little sequence variation was observed in circulating viruses between the samples from each infected cat. Quasispecies of FIV have been detected in this study. The following hematological and clinical chemistry parameters were changed in the FIV-infected cats between the first blood sampling and last blood sampling: packed cell volume (PCV), hemoglobin, total white blood cells (WBC), total protein and gamma globulin fractions. Monitoring of hematological and clinical chemistry parameters may prove useful for the evaluation of disease progress. Regarding receptors, our data are consistent with isolates of the study requiring a less complex interaction with CD134 for infection to proceed compared to the virulent FIV isolates.

Keywords: Feline immunodeficiency vírus. Molecular characterization. Phylogenetic analysis. Disease progression.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 APRESENTAÇÃO.....	22
2 INTRODUÇÃO.....	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivos específicos.....	25

CAPÍTULO II

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA – UMA ATUALIZAÇÃO

1 O VÍRUS E SUAS PROPRIEDADES.....	28
2 EPIDEMIOLOGIA.....	30
3 PATOGENIA	32
4 RESPOSTA IMUNE	34
5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	35
6 DIAGNÓSTICO.....	37
6.1 Testes sorológicos	37
6.2 Testes moleculares – PCR	39
6.3 Isolamento viral	39
6.4 Imunofenotipagem de linfócitos.....	40
7 ABORDAGEM TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA.....	41
8 GRUPOS DE FELINOS.....	42
9 TRATAMENTO.....	44
9.1 Antivirais	44
10 VACINA CONTRA O FIV.....	46
REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO III

FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND ITS RECEPTORS

1 INTRODUCTION	59
ACKNOWLEDGEMENTS	63
REFERENCES	64

CAPÍTULO IV

INTRAHOST GENETIC DIVERSITY OF BRAZILIAN ISOLATE OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

1 INTRODUCTION	69
ACKNOWLEDGEMENTS	77
REFERENCES	78

CAPÍTULO V

SLOWER INTRAHOST EVOLUTION OF V4-V6 ENVELOPE GENE AND PARAMETERS OF DISEASE PROGRESSION IN BRAZILIAN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

1 INTRODUCTION	84
2 MATERIAL AND METHODS	87
2.1 Study animals and sample collection	87
2.2 Detection of retroviral infection	87
2.3 <i>env</i> PCR	88
2.4 PCR product purification and DNA sequencing	88
2.5 Phylogenetic analysis and evolutionary rates	89
2.6 Hemogram and biochemical parameters	89
2.7 Eletrophoretic separation of plasma proteins	90
2.8 Statistical analysis	90
3 RESULTS	91
4 DISCUSSION	97
ACKNOWLEDGEMENTS	102
REFERENCES	103

CAPÍTULO VI

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN SAMPLES OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

1 INTRODUCTION	110
2 MATERIAL AND METHODS	113
2.1 Open shelter.....	113
2.2 Cells and viruses.....	113
2.3 Collection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and sera , virus isolation.....	113
2.4 Cloning and pseudotype virus production	114
2.5 HIV pseudotype assays.....	114
2.6 PCR product purification and DNA sequencing	115
2.7 Phylogenetic analysis	115
2.8 Nucleotide sequence accession numbers.....	116
3 RESULTS	117
4 DISCUSSION.....	120
ACKNOWLEDGEMENTS	122
REFERENCES	123

CAPITULO VII

CONCLUSÕES	128
------------------	-----

ANEXOS	129
--------------	-----

APÊNDICES	130
-----------------	-----

CAPÍTULO I

1 APRESENTAÇÃO

Foi estudada uma população de felinos domésticos residentes ($n= 55$), dos quais 20 eram machos e 35 fêmeas, em uma colônia de gatos, localizada na região de Parelheiros, área metropolitana da Capital paulista. Em sua grande maioria eram animais adotados da rua e tinham contato com outros felinos não domiciliados. As condições higiênicas e sanitárias do local não eram satisfatórias, assim como o manejo nutricional (ANEXO A). Pelos antecedentes do abrigo, onde ocorreu o óbito de vários animais com a síndrome de imunodeficiência dos felinos resultante da infecção pelo FIV, esperava-se que outros felinos contactantes também se encontrassem infectados pelo retrovírus.

Os felinos infectados foram incluídos no estudo mediante a concordância prévia da proprietária do abrigo, firmada em formulário específico. Foram fornecidos todos os esclarecimentos necessários quanto aos procedimentos adotados e a finalidade da pesquisa. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Conselho de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, quanto aos aspectos éticos envolvidos.

Inicialmente foi realizada a triagem dos felinos abrigados no local ($n=55$) para a identificação de todos os animais infectados pelo FIV. De todos os animais co-habitantes foram coletadas amostras de sangue para a avaliação hematológica (hemograma completo) e bioquímica sérica (avaliação renal e hepática, proteína sérica total e frações) e molecular (APÊNDICE A). A infecção pelo vírus da imunodeficiência felina foi comprovada pela pesquisa de anticorpos específicos (teste ELISA) e pela técnica “nested-PCR” – identificando-se o material genético do vírus em células mononucleares do sangue periférico, PBMC.

Após a avaliação clínica e laboratorial e mediante os resultados dos testes para o diagnóstico da infecção pelos retrovírus FIV e FeLV, os animais foram separados em quatro grupos: animais negativos para as retroviroses, infectados pelo FIV, infectados pelo FeLV e infectados por ambas.

Dos felinos infectados pelo FIV foram obtidas amostras de sangue em quatro momentos: T0 (zero), no momento inicial da avaliação e seis, dez e quinze meses após a coleta inicial, correspondendo aos momentos T1, T2 e T3, respectivamente, com a finalidade de avaliar a evolução clínica da infecção e as possíveis variações genéticas intra-hospedeiro

do vírus da imunodeficiência felina. Com as amostras de sangue obtidas na última coleta foram realizadas as tentativas de isolamento viral, clonagem do FIV e a identificação dos receptores de entrada utilizados pelo vírus.

Os testes hematológicos, bioquímicos, e a extração do material genético das amostras dos animais do experimento foram realizados nos laboratórios do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. As amplificações dos genes gag e env do FIV e as reações de sequenciamento foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP. Os isolamentos, as clonagens do FIV e a determinação dos receptores de entrada do vírus foram realizadas no Retrovirus Research Laboratory, Universidade de Glasgow, Escócia. Todos os métodos utilizados no estudo estão descritos no apêndice B.

2 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) é um patógeno dos felinos domésticos, de distribuição mundial e associado com uma variedade de condições mórbidas. Estudos demonstram que o vírus da imunodeficiência felina apresenta prevalência variada de acordo com as diferentes regiões geográficas e o estilo de vida do felino. Existem poucos estudos sobre a variabilidade genética de amostras brasileiras do FIV. A sobrevida dos animais portadores infectados pelo FIV e assintomáticos é relativamente longa o que expõe ao risco da infecção os animais que convivem no mesmo ambiente. A existência de animais infectados e as condições de abrigo aberto, com o livre acesso dos felinos ao meio externo propiciando o contato com felinos errantes, não domiciliados, podem resultar na disseminação da infecção entre os residentes. A ampla heterogeneidade molecular do FIV relatada nos subtipos do vírus identificados ao redor do mundo e a alta capacidade de promover mutações sob pressões imunológicas, farmacológicas ou ambientais são características inerentes aos lentivirus. Em condições de alta densidade populacional e promiscuidade há a possibilidade de ocorrer recombinação genética do vírus infectante, co-infecções ou super infecção dos felinos por variantes de um mesmo subtipo ou por subtipos diferentes do vírus. A identificação do subtipo de vírus predominante na região e o conhecimento da diversidade genética das cepas circulantes são fundamentais no desenvolvimento de estratégias de imunização e no estabelecimento de testes diagnósticos, principalmente os que se baseiam na pesquisa de material genético do vírus. A existência de vários felinos infectados pelo FIV em um abrigo com alta densidade populacional oferece as condições para realizar a identificação do subtipo infectante, a análise das variações genéticas de um mesmo subtipo entre os diferentes indivíduos e o estudo prospectivo das mutações gênicas intra-hospedeiro que podem ocorrer no vírus ao longo do tempo.

3 OBJETIVOS

Realizar a caracterização molecular do vírus da imunodeficiência felina a partir do sangue periférico de felinos doentes ou portadores, co-habitantes de um abrigo aberto de felinos, em São Paulo, SP.

3.1 Objetivos específicos

- Isolamento e caracterização das amostras FIV.
- Estudar a diversidade intra-hospedeira do FIV.
- Determinar se a progressão da doença provocada pelo FIV é influenciada pela evolução viral.
- Avaliar o hemograma e a bioquímica sérica na progressão da doença provocada pelo FIV.
- Estudar a interação entre os envelopes dos isolados do estudo com os receptores celulares.

CAPÍTULO II

VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA – UMA ATUALIZAÇÃO

RESUMO

Desde o primeiro isolamento do vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV), pesquisadores realizam esforços para a compreensão da infecção pelo FIV, da patogênese da doença e das manifestações clínicas verificadas nos animais infectados pelo vírus. O FIV é tanto um importante patógeno felino bem como serve como modelo experimental para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) - Síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). Este artigo revisa o atual conhecimento da infecção pelo FIV.

Palavras-chave: Gato. *Retroviridae. Lentivirus.*

ABSTRACT

Since feline immunodeficiency virus (FIV) was first isolated, international research efforts have focussed on the understanding of FIV infection, pathogenesis and clinical signs of infection in the domestic cats. Those studies are due to FIVs importance as a veterinary pathogen and an animal model for human immunodeficiency virus (HIV)/ acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). This article reviews the current state of knowledge of the FIV infection.

Keywords: Cat. *Retroviridae. Lentivirus.*

RESUMEN

Desde el primer aislamiento del virus de inmunodeficiencia de los felinos (FIV), los investigadores realizan esfuerzos para la comprensión de la infección por FIV, como la patogenicidad de la enfermedad y las manifestaciones clínicas verificadas en los animales infectados por el virus. El FIV es un importante patógeno felino además sirve como modelo experimental para el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) - Síndrome de inmunodeficiencia humana (AIDS). Este artículo revisa el estado actual del conocimiento de la infección por el FIV.

Palabras clave: Gato. *Retroviridae. Lentivirus.*

1 O VÍRUS E SUAS PROPRIEDADES

O vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) é um membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* ao qual também pertence o HIV, vírus causador da imunodeficiência humana a vírus. Ambos são estruturalmente semelhantes e possuem ciclo de vida e patogenicidade também similares. Como ocorre com o HIV, a principal característica da infecção pelo FIV é o gradual declínio no número de linfócitos T periféricos CD4+ e a consequente síndrome de imunodeficiência (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 2007). É importante ressaltar que os humanos não são susceptíveis à infecção pelo FIV. Os diferentes FIVs constituem um grande e antigo grupo de vírus, específico dos felídeos tendo sido isolados de diversos felinos não domésticos como pumas, leões e leopardos (OLMSTED et al., 1992; CARPENTER et al., 1996; BARR et al., 1997). Em gatos domésticos, o vírus foi isolado em 1986 a partir de um gato mantido em um abrigo de felinos, na Califórnia, Estados Unidos, por Pedersen et al. (1987).

O vírion tem 105-125 nm de diâmetro, possui forma de esférica a helicoidal e um envelope externo com pequenas projeções pouco definidas. A partícula viral é constituída por duas fitas simples de RNA não complementares, idênticas, de polaridade positiva com 9,4 kilobases. O genoma do FIV se compõe de três grandes regiões genômicas, *gag*, *pol* e *env*, que codificam respectivamente as proteínas estruturais internas, as enzimas e as proteínas do envelope, além de vários genes acessórios. O gene *gag* codifica proteínas estruturais como matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC). O gene *pol* codifica enzimas importantes como transcriptase reversa (RT), dUTPase (DU), protease (PR) e integrase (IN). O gene *env* codifica proteínas do envelope viral: a glicoproteína de superfície (SU), gp120, e a glicoproteína transmembranar (TM), gp41 (OLMSTED et al., 1989; BENDINELLI et al., 1995). O gene *env* determina a interação entre o vírus e o receptor celular; a especificidade desta interação define a patogenicidade e o tropismo celular/tecidual (SHIMOJIMA et al., 2004).

Baseados na análise da sequência de nucleotídeos do gene *env* das regiões variáveis 3-5, o FIV pode ser classificado em 5 subtipos filogeneticamente distintos, de A a E, além de cepas recombinantes (SODORA et al., 1994a,b; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). Este número poderá aumentar com futuros estudos revelando adicionais diversidades do vírus. Recentes estudos identificaram distintos grupos de isolados de FIV nos Estados Unidos e na Nova Zelândia (WEAVER et al.,

2004; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). O subtipo A tem sido relatado no Reino Unido, no oeste dos Estados Unidos, no norte do Japão, na Austrália, Alemanha e África do Sul (SODORA et al., 1994a,b; KANN et al., 2007) enquanto o subtipo B está presente nos centro e leste americanos, no leste do Japão, e nos países do sul europeu (YAMAMOTO et al., 2007). Já o subtipo C tem sido identificado na Califórnia, USA, e na Nova Zelândia (HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007) enquanto os subtipos D e E são relatados no Japão e na Argentina respectivamente (KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996). A maioria dos vírus identificados pertence aos subtipos A e B (YAMAMOTO et al., 2007) e um mesmo felino pode ser infectado por mais de um subtipo (REGGETI; BIENZLE, 2004). A caracterização molecular dos isolados do FIV no Brasil revelou até o presente momento a presença do subtipo B em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (CAXITO et al., 2006; LARA; TANIWAKIII; ARAÚJO JR, 2007; TEIXEIRA et al., 2007; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008).

A ampla heterogeneidade molecular do FIV relatada nos subtipos do vírus identificados ao redor do mundo e a alta capacidade de promover mutações sob pressões imunológicas, farmacológicas ou ambientais são características inerentes aos *Lentivirus*. Em condições de alta densidade populacional e promiscuidade, há a possibilidade de ocorrer recombinação genética do vírus infectante, co-infecções ou superinfecção dos felinos por variantes de um mesmo subtipo ou por subtipos diferentes do vírus. A heterogeneidade nas sequências do ácido nucléico é o resultado da natureza errática da enzima transcriptase reversa (RT), bem como da alta taxa de produção de vírions. Essa heterogeneidade permite ao vírus uma rápida adaptação ao sistema imune, às drogas antivirais ou a ambos, constituindo-se no mecanismo do escape viral frente a pressões farmacológicas, imunológicas ou pressões de seleção ambiental (ROBERTS; BEBENEK; KUNKEL, 1988). O grau de variabilidade entre as amostras isoladas de um mesmo indivíduo é evidente, havendo ainda maior diversidade entre os subtipos isolados de diferentes indivíduos (TEIXEIRA et al., 2009).

O vírus sobrevive apenas alguns minutos fora do hospedeiro e é suscetível a maioria dos desinfetantes incluindo o sabão comum (HOSIE et al., 2009).

2 EPIDEMIOLOGIA

O vírus da imunodeficiência felina encontra-se amplamente disseminado em todo o mundo (HOSIE; BEATTY, 2007; YAMAMOTO et al., 2007). A prevalência da infecção é altamente variável entre as diferentes regiões geográficas; é maior onde existe uma alta densidade populacional de felinos de vida livre ou errantes, como no Japão e na Itália (PISTELLO et al., 1997) e baixa em colônias de gatos fechadas, em que os animais não têm contato com os de rua.

As taxas da infecção pelo FIV entre os gatos domésticos assintomáticos variam de 1 a 14%, de acordo com as diferentes regiões, idade, sexo e risco de exposição (BACHMANN et al., 1997). A taxa de infecção é cerca de duas vezes maior entre os gatos doentes, comparada com a dos felinos assintomáticos (KAKINUMA et al., 1995; HARTMANN, 1998).

A infecção dos felinos brasileiros pelo FIV foi detectada inicialmente no ano de 1993 (RECHE JR; HAGIWARA, 1993). Anticorpos contra o FIV foram detectados em 6,5 % dos felinos assintomáticos (8/123) e em 14 % dos animais doentes (39/278), em 1997 na cidade de São Paulo (RECHE JR; HAGIWARA; LUCAS, 1997); a taxa de infecção de 18,24% foi relatada na cidade do Rio de Janeiro (SOUZA; TEIXEIRA; GRAÇA, 2002) e de 13,95 % em gatos doentes e 1,47% em gatos sadios em Belo Horizonte, MG (CAXITO et al., 2006). A taxa de infecção é maior que 50% em felinos com gengivite, uma das condições mórbidas fortemente associadas à infecção pelo FIV (DANIEL; HAIPEK; RECHE JR., 2006).

As feridas por mordeduras constituem-se o modo mais frequente na transmissão do vírus (YAMAMOTO et al., 1989). Gatos adultos, machos, com livre acesso a ambientes externos ou a adoção de adultos errantes constituem-se nos principais fatores de riscos de infecção para os residentes no ambiente doméstico ou nos abrigos. As taxas de soroprevalência em machos são duas ou mais vezes maiores do que em fêmeas. Isso pode ser explicado pela diferença no comportamento social dos felinos (BENDINELLI et al., 1995). Dados epidemiológicos indicam que os gatos infectados na primeira fase da doença transmitem com maior facilidade o vírus do que os gatos apresentando a fase terminal da doença (HOSIE; BEATTY, 2007).

A transmissão de mães para filhotes pode ocorrer no útero, durante o parto ou pela ingestão de colostro e do leite (SELLON et al., 1994; ALLISON; HOOVER, 2003a,b). Os filhotes de gatas soropositivas saudáveis podem tornar-se persistentemente infectados, dependendo da carga viral da progenitora durante a gravidez e no parto. Se a gata estiver na

fase aguda da infecção, mais de 70% dos filhotes podem nascer infectados (O'NEIL et al., 1995).

Embora a transmissão oronasal e a venérea não tenham sido documentadas naturalmente, os gatos podem ser infectados experimentalmente, via inoculação na mucosa nasal, gengival, vaginal e retal. Após infecção experimental e natural, o vírus também pode ser encontrado no sêmen (MOENCH et al., 1993; JORDAN et al., 1998a,b). De qualquer maneira a importância epidemiológica dessas formas de transmissões ainda não está bem definida.

3 PATOGENIA

O principal alvo da infecção pelo FIV é constituído pelos linfócitos T CD4+ ativados (PEDERSEN et al., 1989). Essas células também conhecidas como células T “helper” desenvolvem um papel central na função imune tanto na resposta humoral, produção de anticorpos, quanto na resposta celular (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1997). Diferentemente do HIV, o FIV não utiliza CD4 como receptor. O receptor primário para o FIV é o CD134, também conhecido como OX40, um membro da família dos receptores dos fatores de necrose tumoral, que é altamente expresso nas células T CD4+ ativadas (SHIMOJIMA et al., 2004). Inicialmente a glicoproteína 120 – gp120 - se liga ao receptor CD134 promovendo alterações no envelope viral que favorecem uma segunda interação com o co-receptor, CXCR4, resultando-se assim a fusão viral à membrana celular do hospedeiro e a entrada do vírus na célula hospedeira (WILLETT; HOSIE, 2008). A rápida mutação do lentivirus na região *env*, citado no primeiro tópico deste trabalho, desencadeia gerações de novas variantes com uma grande diversidade genética (HUISMAN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010).

O FIV infecta também os linfócitos T CD8+, macrófagos, linfócitos B, astrócitos e células microgliais (BRUNNER; PEDERSEN, 1989; ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996; HEIN et al., 2000; JOSHI et al., 2005). Recentemente foi relatada a infecção de células T reguladoras pelo vírus (JOSHI et al., 2005). A infecção torna-se latente quando as células apresentam o provírus integrado no DNA celular, porém não há produção de partículas virais. Células com infecções latentes representam “reservatórios” da infecção que não são ricas em anticorpos neutralizantes (MCMICHAEL, 2006).

Na fase aguda da doença, raramente identificada em condições de campo, observa-se uma síndrome similar à do HIV, incluindo episódios de febre e linfoadenopatia generalizada. Apesar da vigorosa e rápida resposta imune dos hospedeiros infectados pelo vírus (INOSHIMA et al., 1996) não há, na maioria das vezes, a depuração da infecção, resultando-se na persistência viral. Nos primórdios da infecção, os vírus se replicam em linfócitos T CD4+, células dentríticas e macrófagos e em 2 semanas são encontrados no plasma. O pico de carga viral ocorre entre 8 a 12 semanas após o início da infecção. A diminuição na carga viral marca o início da fase assintomática. Segue-se um longo período assintomático, tipicamente observado nas infecções por *Lentivirus*, de meses a anos de duração, quando a relação de linfócitos T CD4+/CD8+ declina gradualmente. Durante este período, pode ser detectada uma

progressiva deficiência qualitativa e quantitativa do sistema imune dos felinos experimentalmente infectados (BARLOUGH et al., 1991). Nesta fase a replicação viral é controlada pela resposta imune do hospedeiro e alterações clínicas são dificilmente observadas (HOSIE et al., 2009).

O curso e o prognóstico da doença são variáveis, dependendo das condições ambientais, infecções oportunistas, idade do hospedeiro, carga viral, cepa envolvida e das condições clínicas do gato no momento em que se estabelece a infecção. O período assintomático pode evoluir para o estágio caracterizado por uma variedade de distúrbios associados à síndrome da imunodeficiência que pode resultar na morte dos animais. Nesta última fase há uma alta taxa de carga viral e considerável diminuição dos linfócitos T CD4+ (HOSIE; BEATTY, 2007).

4 RESPOSTA IMUNE

Nas infecções naturais, não se conhece a eficácia da imunidade do colostrum. Experimentalmente, os filhotes apresentaram proteção contra as cepas laboratorialmente adaptadas, após receberem anticorpos de animais infectados pelo FIV (PU et al., 1995). Porém, isto não pode ser extrapolado para desafios com cepas virulentas de campo. Demonstrou-se experimentalmente que a infecção pode ser exacerbada pela transferência de anticorpos obtidos dos felinos vacinados, indicando a existência de um sutil equilíbrio entre neutralização viral e exacerbamento da resposta imune (SIEBELINK et al., 1995).

Gatos infectados pelo FIV permanecem persistentemente infectados apesar da grande produção de anticorpos (Acs) e da resposta imune celular contra o vírus. Células T CD8+ específicas contra o FIV podem ser detectadas no sangue do hospedeiro após uma semana de infecção (BEATTY et al., 1996). Os anticorpos contra o FIV, incluindo os neutralizantes, são encontrados no plasma em presença de altas taxas de carga viral no sangue periférico (FEVEREIRO et al., 1991). Podem ser reconhecidos de 2 a 4 semanas após o início da infecção (O'CONNOR et al., 1989). Os Acs que reconhecem as glicoproteínas do envelope viral, *env*, são produzidos mais precocemente, quando comparados aos Acs anti-p24 do *gag* (RIMMELZWAAN et al., 1994). Não há diferença no título de Acs neutralizantes entre os gatos assintomáticos e aqueles que se apresentam com manifestações clínicas decorrentes da infecção (MATTEUCCI et al., 1993).

5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A maioria das manifestações clínicas não é causada diretamente pela infecção viral sendo de fundamental importância identificar as causas subjacentes. Em muitos casos, o quadro clínico é o resultado de infecções secundárias que devem ser identificadas e tratadas. As alterações clínicas observadas nos animais persistentemente infectados são numerosas e extremamente variáveis, de caráter esporádico ou persistente, à medida que a infecção progride (BARLOUGH et al., 1991). A infecção pelo FIV está associada à imunodeficiência, tornando os animais mais susceptíveis a outras infecções ou ao desenvolvimento de neoplasias; pode também ser responsável por uma exacerbada resposta imune, que pode resultar em doenças imunomediadas (HOSIE et al., 2009). O FIV pode, eventualmente, constituir-se em agente infeccioso oportunista em felinos previamente infectados e imunossuprimidos, justificando em parte as sobreposições de infecções por diferentes subtipos ou variantes de um mesmo subtipo do vírus em um mesmo hospedeiro (WEISS, 1993).

Na fase inicial da infecção pelo FIV manifestações como febre, linfoadenopatia e sinais vagos de comprometimento sistêmico como anorexia e depressão podem ser observados, persistindo por algumas semanas e desaparecendo na longa fase crônica da infecção. Apenas a linfoadenopatia pode persistir por todo o período de infecção, indicando hiperplasia linfóide, como resposta à infecção (DEL FIERRO et al., 1995). A alteração hematológica mais evidente na fase aguda da infecção é a neutropenia (PEDERSEN et al., 1989).

Em geral, após a fase aguda os animais infectados permanecem saudáveis até o aparecimento das alterações clínicas associadas ao desenvolvimento da imunodeficiência. Na maioria dos casos esse período de latência clínica perdura anos; alguns gatos não apresentam manifestações clínicas relacionadas à infecção viral durante toda a vida (ADDIE et al., 2000). A fase assintomática é em média de 6 anos para a maioria dos felinos infectados (YAMAMOTO et al., 1989).

A imunodeficiência e/ou a exacerbada resposta imune manifestam-se frequentemente sob a forma de gengivite-estomatite crônica, linfoadenopatia, perda de peso e glomerulonefrite imunomediada. Infecções concomitantes envolvendo protozoários, vírus e bactérias são frequentemente relatadas em gatos infectados pelo FIV (BENDINELLI et al., 1995; HUGHES et al., 1999). Dermatopatias, principalmente as infecções cutâneas e/ou

tumores (particularmente linfomas de células B) devem alertar os clínicos veterinários para a possibilidade de infecção pelo FIV (CALLANAN et al., 1996).

Os felinos infectados podem apresentar aumento de gamoglobulina sérica, como reflexo da hiperatividade de células B específicas contra o vírus (FLYNN et al., 1994). Alterações hematológicas são bastante frequentes nos gatos positivos para o vírus (SHELTON et al., 1990b). Anemia, neutropenia, trombocitopenia e linfopenia estão presentes entre um terço e a metade dos gatos doentes (ACKLEY et al., 1990).

Gengivite-estomatite crônica é uma das alterações mais comum apresentadas pelos pacientes infectados (TENORIO et al., 1991), figura 1. Em casos raros o vírus pode causar distúrbios neurológicos (HOSIE et al., 2009). Manifestações neurológicas descritas nos animais infectados incluem alterações de comportamento, alteração nos padrões de sono, dificuldade de aprendizado, convulsões, alterações eletroencefalográficas e paresias (PROSPERO-GARCIA et al., 1994; BENDINELLI et al., 1995; HENRIKSEN et al., 1995; PHILLIPS et al., 1996).

Alterações renais envolvendo lesões glomerulares e tubulointersticial associadas com severa proteinúria são frequentes nos gatos positivos para o FIV na última fase da doença. Essas lesões renais são possivelmente causadas pelo próprio vírus e pela deposição de imunocomplexos nas estruturas glomerulares nos animais persistentemente infectados (POLI et al., 1995a,b; MATSUMOTO et al., 1997).



Foto: Alexandre G. T. Daniel e Archivaldo Reche Junior

Figura 1 - Felino infectado pelo vírus da imunodeficiência felina

6 DIAGNÓSTICO

Procedimentos atuais para detecção da infecção pelo FIV incluem métodos de detecção direta, isolamento viral e testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), e métodos de detecção indireta, testes imunológicos para detecção de anticorpos vírus-específicos como ELISA, imunocromatografia e *Western blot*, considerado “gold Standard” para o diagnóstico sorológico do vírus (HOSIE et al., 2009). O diagnóstico da infecção não pode ser estabelecido observando-se somente as alterações clínicas dos pacientes (BENDINELLI et al., 1995). É importante identificar os gatos infectados, como parte das medidas profiláticas para a prevenção da infecção dos susceptíveis.

6.1 Testes sorológicos

Em contraste com a maioria das viroses, a simples demonstração de anticorpos anti-FIV no soro pode ser considerada adequada para o diagnóstico de uma infecção atual, já que ocorre a persistência da infecção viral, mesmo diante de resposta imunológica adequada do hospedeiro (BENDINELLI et al., 1995).

Os testes de rotina para a infecção do FIV se baseiam na detecção de anticorpos que reconhecem proteínas estruturais do vírus (como a p24 e p15) e uma das glicoproteínas do envelope viral, gp41. Esses testes podem ser encontrados na forma de ensaio imunoenzimático (ELISA e imunocromatografia). Um dos testes disponível hoje em todo o país é o kit comercial baseado no ensaio de imunoabsorção enzimática (SNAP COMBO® anticorpo-FIV/antígeno-FeLV, Laboratório IDEXX) que pode ser usado nas clínicas veterinárias e em abrigos (Figura 2). O diagnóstico da infecção baseada na pesquisa de anticorpos anti-FIV por técnicas imunoenzimáticas é rápido e apresenta alta sensibilidade e especificidade (O'CONNOR et al., 1989; CRAWFORD; LEVY, 2007).

Os resultados do teste devem ser interpretados cuidadosamente (CRAWFORD; LEVY, 2007). Quando é encontrado um resultado positivo em um animal com baixo risco de infecção, por exemplo, gato sem histórico de acesso a rua, o resultado deve ser confirmado por novos testes, como *Western blot*. Resultado positivo em um gato pertencente a um grupo de risco (gato macho, adulto, com acesso à rua) tem um valor preditivo positivo alto, isto é trata-se realmente de um animal infectado. Resultados falsos negativos podem ser encontrados na fase terminal da doença em animais com baixos títulos de anticorpos, em

conseqüência da imunodeficiência ou em casos de infecções recentes, em que não houve tempo hábil para ocorrer a soroconversão. Muitas vezes existe um lapso de tempo de semanas a meses após a infecção, para se obter um resultado positivo nos testes sorológicos. Títulos baixos de anticorpos também poderão ser encontrados em presença de alta concentração do vírus no sangue, o que resulta na formação de imunocomplexos e seqüestro de anticorpos (CRAWFORD; LEVY, 2007). A presença de anticorpos maternos em filhotes nascidos de mães positivas ao FIV pode resultar em testes positivos. Portanto, os testes devem ser realizados após 16 semanas de idade, tempo suficiente para eliminação completa dos anticorpos maternos. Em alguns casos raros, os anticorpos maternos podem persistir por mais de 16 meses e, desta maneira, novo teste deve ser realizado dois meses após o primeiro (LEVY et al., 2003). A reação em cadeia da polimerase, PCR, neste caso constitui-se em uma excelente ferramenta, levando-se em consideração a necessidade de realizar o teste também na mãe para a identificação correta da cepa infectante envolvida.

O *Western Blot* pode também ser utilizado para confirmar resultados inconclusos, porém esses testes não são disponibilizados para fins de diagnóstico clínico. Neste testes, o vírus é primeiramente purificado e suas proteínas separadas em um gel de eletroforese. Desta maneira, as proteínas podem ser detectadas por anticorpos específicos presentes nos soros dos animais positivos. Amostras contendo anticorpos que se ligam em duas ou mais proteínas são interpretadas como positivas para o FIV (O'CONNOR et al., 1989; BARR et al., 1991; BARR, 1996).

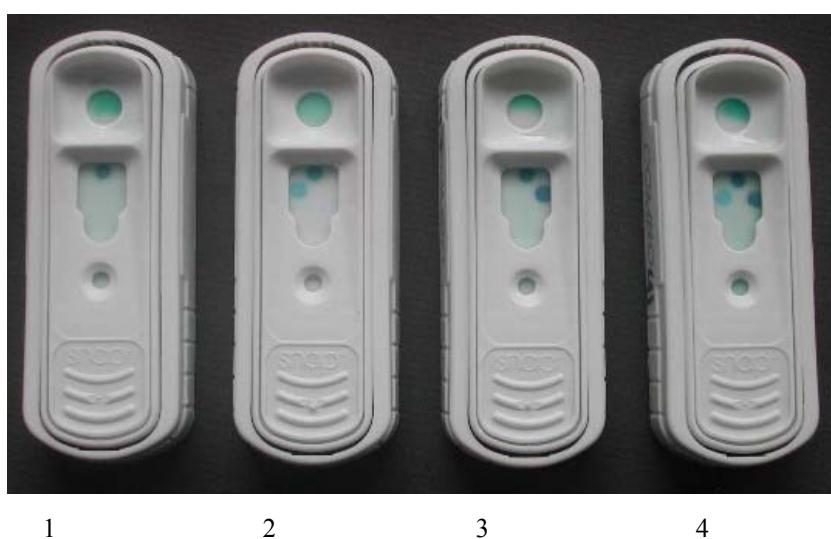


Figura 2 - Foto dos possíveis resultados encontrados no SNAP Combo – Kit de teste de抗ígenos do vírus da leucemia / anticorpos do vírus da imunodeficiência felina – IDEXX. SNAP 1 – Amostra negativa para FIV e FeLV. SNAP 2 – Amostra positiva apenas para o FIV. SNAP 3 – Amostra positiva apenas para o FeLV. SNAP 4 – Amostra positiva para FIV e FeLV

6.2 Testes moleculares – PCR

Os testes moleculares (PCRs), que detectam o DNA proviral do FIV, constituem-se em importante ferramenta de diagnóstico (BIENZLE et al., 2004) e são oferecidos por alguns laboratórios de Universidades e da iniciativa privada no país. Tanto os testes moleculares quanto os testes sorológicos possuem sensibilidade e especificidade diferentes, de modo que em algumas ocasiões não há concordância entre os resultados.

A identificação do subtipo de vírus predominante na região e o conhecimento da diversidade genética das cepas circulantes são fundamentais para a produção e validação de testes diagnósticos, principalmente aqueles que se baseiam na pesquisa de material genético do vírus. Em geral, os métodos moleculares são altamente influenciados pelas variações nas sequências-alvo. Recentemente, estudos moleculares vem sendo realizados para um maior conhecimento das cepas brasileiras do vírus (LARA; TANIWAKI; ARAÚJO JR, 2007; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009). Na fase crônica da doença, as concentrações dos抗ígenos virais circulantes podem ser mais baixas do que o limiar de detecção dos métodos de detecção direta (LEVY; CRAWFORD; SLATER, 2004). O sequenciamento do produto das PCRs, com a demonstração da presença da seqüência viral esperada, auxilia na identificação das reações positivas falsas (BASTIEN; CHABBERT; LACHAUD, 2003). Resultados negativos falsos na PCR podem ocorrer pela inadequação das amostras, erro no emparelhamento entre os iniciadores, *primers*, e as seqüências virais, uma insuficiente quantidade do vírus na amostra e inadequada preparação dos componentes da reação de PCR (BORST; BOX; FLUIT, 2004).

6.3 Isolamento viral

O isolamento viral, com o co-cultivo de linfócitos do sangue periférico dos animais suspeitos com células T primárias de felinos (MIYAZAWA et al., 1989), permite o diagnóstico da infecção, porém é bastante laborioso e não é usado na rotina clínica (HOSIE et al., 2009).

6.4 Imunofenotipagem de linfócitos

A contagem dos linfócitos CD4+ e CD8+ pode ser importante na avaliação da disfunção imunológica dos animais positivos para o FIV (BENDINELLI et al., 1995). Porém, devido sua complexidade e a dificuldade de se conhecer os valores anteriores a infecção, esses testes não são úteis na rotina clínica.

7 ABORDAGEM TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA

Como regra geral, o diagnóstico da infecção pelo FIV é estabelecido quando o animal apresenta alguma condição mórbida em que se suspeita do envolvimento do vírus e se realiza o teste de diagnóstico específico ou quando é contactante de um animal sabidamente positivo. Muitos animais infectados permanecem sem nenhuma manifestação clínica durante anos. Nessas condições, alguns cuidados dever ser observados.

Uma das medidas profiláticas mais importantes é a de proteger os animais infectados pelo FIV de outras infecções ou de se constituir em fonte de infecção para outros animais. Prevenir o acesso a rua, manter os felinos positivos separados dos FIV-negativos e dos felinos com outras doenças infecciosas, a castração, para minimizar a agressividade e modificar o comportamento dos machos, constituem-se em medidas a ser adotadas, uma vez confirmada a infecção pelo FIV. Gatos infectados pelo FIV devem ser submetidos ao exame clínico pelo menos a cada 6 meses e sempre monitorados quanto ao peso e possíveis alterações hematológicas ou bioquímicas.

Vacinação dos gatos positivos é um assunto bastante controverso. Uma imunoestimulação causada pela vacina pode levar a progressão da doença e uma estimulação de linfócitos positivos para o vírus promove uma maior produção de partículas virais (HOSIE et al., 2009). Linfócitos ativos expressam um maior número de receptores favorecendo assim a infecção viral (DE PARSEVAL et al., 2005; REGGETI; ACKERLEY; BIENZLE, 2008). Vacinação de gatos, cronicamente infectados pelo FIV, como peptídeos sintéticos, foi associada à queda da relação CD4/CD8 (HOSIE; BEATTY, 2007). Portanto, o risco e o benefício da vacinação deverão sempre ser avaliados. De qualquer maneira, animais positivos com livre acesso à rua deveriam sempre receber o reforço vacinal (LEVY et al., 2003).

8 GRUPOS DE FELINOS

O risco de transmissão do vírus é pequeno em um grupo de animais socialmente adaptados. Como o vírus é transmitido majoritariamente por mordidas nas brigas entre os felinos, a inexistência de episódios agressivos em função da estabilidade social e da adaptação territorial, diminui consideravelmente a probabilidade de transmissão da doença (LEVY et al., 2003). A identificação de um gato positivo indica a necessidade de realizar o teste diagnóstico e a castração de todos os animais que compartilham o mesmo ambiente. Adicionalmente, nenhum outro gato deve ser introduzido no grupo, pois isto pode alterar a harmonia e o equilíbrio social entre aqueles que coabitam pacificamente por muitos anos (HOSIE et al., 2009). Na presença de outros agentes infecciosos entre os felinos do grupo, recomenda-se a separação e o isolamento dos animais infectados pelo FIV, já que a superposição de infecções pode acelerar a evolução da imunodeficiência desses animais.

Nos abrigos, a presença de felinos infectados pelo FIV é uma possibilidade que deve ser levada em consideração, já que muitos animais foram resgatados da rua ou haviam tido livre acesso a rua (PISTELLO et al., 1997). A sobrevida dos animais portadores infectados pelo FIV é relativamente longa, o que expõe os animais que convivem no mesmo ambiente ao risco da infecção. Nos abrigos abertos, os felinos com livre acesso ao ambiente externo podem ter contato com os felinos errantes, não domiciliados, adquirindo ou disseminando a infecção. As recomendações dos especialistas em felinos da comunidade européia e dos Estados Unidos (*European Advisory Board on Cat Diseases*, ABCD, e a *The American Association of Feline Practitioners*, AAFP, respectivamente) preconizam que todos os gatos sejam testados e a eutanásia dos animais positivos com manifestações clínicas associadas com a fase terminal da doença (LEVY et al., 2003; HOSIE et al., 2009). Os animais FIV positivos devem ser isolados; os novos ingressantes devem sempre ser testados antes de serem introduzidos e colocados em seus respectivos alojamentos. Animais positivos saudáveis podem ser colocados para adoção, desde que se evite o contato com outros gatos não infectados.

Em gatís de criação, os felinos são mantidos sem acesso à rua, portanto o risco de se encontrar a infecção pelo FIV em um gato é raro. Entretanto, considerando-se a atividade reprodutiva, todos os gatos devem ser periodicamente submetidos ao teste sorológico, assim

como os gatos novos, antes de introduzidos no plantel. É recomendável que os reprodutores sejam portadores de um atestado médico veterinário indicando a ausência de infecção. Gatos que por qualquer motivo tenham tido acesso à rua devem ser mantidos em quarentena, durante três meses, e retestados, antes de serem reintroduzidos no plantel (LEVY et al., 2003).

9 TRATAMENTO

O tratamento na maioria das vezes é o de suporte e dirigido contra as condições mórbidas associadas, concomitantes ou subjacentes. A gengivite/estomatite crônica pode requerer o uso de antiinflamatórios esteróides ou ainda de drogas imunossupressoras, porém seu uso é bastante controverso devido aos efeitos colaterais dessas drogas (BARR et al., 2000a,b; PEDERSEN et al., 2003). Nas formas mais graves e refratárias aos tratamentos instituídos, recomenda-se a extração de todos os dentes.

Gatos infectados doentes devem ter diagnósticos rápidos e precisos para que uma definição e a intervenção possam ser realizadas o mais cedo possível. Vários animais FIV positivos respondem à medicação tão bem quanto animais negativos embora uma maior ou mais agressiva terapia, como na antibióticoterapia, possa ser necessária. As alterações hematológicas são comuns na infecção pelo FIV, principalmente a anemia e a neutropenia. A eritropoetina recombinante humana apresenta resultados satisfatórios nos animais com anemia não regenerativa devido a baixas concentrações séricas de eritropoetina endógena associadas à insuficiência renal crônica. Não há alterações na carga viral (ARAI et al., 2000). Filgastrin, um fator estimulador de colônias de granulócitos, tem sido usado em animais com severa neutropenia, porém deve-se ter em mente a possibilidade de aumento da carga viral associada com o aumento da contagem de neutrófilos (ARAI et al., 2000; PHILLIPS et al., 2005). A griseofulvina apresenta efeitos supressivos sobre a medula óssea e, portanto nunca deve ser utilizada nos felinos infectados pelo FIV (SHELTON et al., 1990a).

9.1 Antivirais

Drogas antivirais utilizadas para o tratamento do HIV são sempre lembradas e questionadas no tratamento para o FIV, porém vários desses antivirais apresentam toxicidade para os felinos domésticos (HOSIE et al., 2009).

AZT (3'-azido-2',3-dideoxythymidine) é um análogo de nucleosídeo que bloqueia a transcriptase reversa dos retrovírus e inibe a replicação *in vitro* e *in vivo* do FIV. Seu uso pode reduzir a carga viral, melhorando a qualidade de vida dos animais positivos (HARTMANN et al., 1992). A avaliação hematológica deve ser realizada semanalmente nos primeiros meses

devido à anemia não regenerativa observada em doses elevadas. Por este mesmo motivo, o tratamento com esse antiviral não é recomendado para os gatos que apresentam supressão medular (HARTMANN et al., 1997). A semelhança do que ocorre com o HIV, o uso da droga resulta no aparecimento de mutantes do vírus resistentes ao fármaco, já no início do tratamento (KURITZKES, 2007; MARTINS et al., 2008). O AZT não se encontra disponível para o uso veterinário. Outro medicamento, ainda não licenciado como antiviral, que é bastante promissor é o AMD3100. Esta molécula atua como um seletivo antagonista do receptor de citocina CXCR4, o co-receptor do FIV, que, quando bloqueado com o AMD3100, inibe a entrada do vírus. Esta molécula diminui os sinais clínicos dos animais e reduz a carga viral nos hospedeiros (WILLETT et al., 1997; EGBERINK et al., 1999; HOSIE et al., 2009).

O interferons são citocinas com atividade antiviral, imunomoduladora e antineoplásica. O interferon-alfa recombinante humano, administrado por via oral, pode induzir um estado antiviral nas células, além de apresentar efeito imunomodulador no hospedeiro (TOMPKINS, 1999). O uso de interferon-alfa humano nos animais infectados pelo FIV é bastante controverso (TANABE; YAMAMOTO, 2001; RIONDATO et al., 2003), pois é específico da espécie humana e pode apresentar efeitos colaterais em gatos (HOSIE et al., 2009). No entanto, um protocolo de tratamento é encontrado na literatura relatando efeitos desta citocina prolongando a vida dos animais infectados pelo FIV (DE MARI et al., 2004).

Recentemente, um interferon-omega felino foi licenciado para uso veterinário na Europa e no Japão. Este pode ser usado durante toda a vida do felino sem induzir produção de anticorpos, como ocorre com citocina humana (HOSIE et al., 2009) e parece bastante promissor pois além de ser específico dos felinos apresentou uma boa atividade, *in vitro*, contra o FIV. Entretanto, o único estudo em campo realizado com esta molécula não demonstrou significativa melhora nas taxas de sobrevivência dos animais infectados (DE MARI et al., 2004).

10 VACINA CONTRA O FIV

A rápida mutação dos *Lentivirus* na região do envelope viral com uma geração de novas variantes ou a superposição da infecção com diferentes subtipos constitui-se em um dos principais empecilhos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o FIV. Vacinas desenvolvidas com um único subtipo protegem contra a infecção homóloga, mas podem falhar na proteção contra cepas divergentes que apresentem mais de 20 % de diferença nas sequências do gene *env* (ELYAR et al., 1997).

Experimentalmente, diferentes imunógenos apresentaram eficácia variável de acordo com os desafios realizados (HOSIE; BEATTY, 2007). Uma vacina com preparados de vírus inteiros inativados, subtipo A (Petaluma) e D (Shizuoka), Fel-O-Vax FIV, *Fort Dodge Animal Health*, foi aprovada para uso nos Estados Unidos, no Japão, na Austrália e na Nova Zelândia (UHL et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2007). A vacina é amplamente utilizada nos Estados Unidos, onde nenhum caso de infecção foi relatado em animais vacinados desde sua liberação, em 2002 (YAMAMOTO et al., 2007). Entretanto, recentemente foi demonstrada a limitada eficiência da vacina inativada contra a infecção por um subtipo homólogo (FIV Glasgow - 8 - subtipo A). Animais vacinados apresentaram carga viral plasmática maior na fase aguda da infecção após o desafio, quando comparados aos felinos não vacinados (DUNHAM et al., 2006).

Apesar de promover considerável proteção contra o desafio com o subtipo B, não incluído na vacina, sua eficácia ainda não foi totalmente comprovada em condições de campo (UHL et al., 2002). Não há vacina comercialmente disponível no Brasil contra a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina, salientando-se que até o momento, todos os isolados brasileiros foram caracterizados como sendo do subtipo B.

A *European Advisory Board on Cat Diseases*, ABCD, não recomenda o uso da vacina na Europa devido à impossibilidade de diferenciar animais vacinados dos animais infectados, por meio dos testes sorológicos disponíveis no mercado. Também não foi cabalmente comprovada a eficácia da vacina contra as amostras de campo daquele continente (HOSIE et al., 2009).

O sucesso ou a falha de uma vacina em promover uma proteção adequada pode ser explicado pela ocorrência de variantes altamente divergentes do vírus (PISTELLO et al., 1997) de modo que é de fundamental importância a determinação da diversidade genética das cepas de FIV circulantes na região onde se planeja a implantação da vacinação dos suscetíveis.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia, 1997, v. 16.
- ACKLEY, C. D.; YAMAMOTO, J. K.; LEVY, N.; PEDERSEN, N. C.; COOPER, M. D. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 64, n. 11, p. 5652-5655, Nov, 1990.
- ADDIE, D. D.; DENNIS, J. M.; TOTH, S.; CALLANAN, J. J.; REID, S.; JARRETT, O. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record**, v. 146, n. 15, p. 419-424, Apr, 2000.
- ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 3, p. 245-253, Mar, 2003a.
- ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 5, p. 421-434, May, 2003b.
- ARAI, M.; DARMAN, J.; LEWIS, A.; YAMAMOTO, J. K. The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. **Veterinary Immunol and Immunopathology**, v. 77, n. 1-2, p. 71-92, Nov, 2000.
- BACHMANN, M. H.; MATHIASON-DUBARD, C.; LEARN, G. H.; RODRIGO, A. G.; SODORA, D. L.; MAZZETTI, P.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4241-4253, Jun, 1997.
- BARLOUGH, J. E.; ACKLEY, C. D.; GEORGE, J. W.; LEVY, N.; ACEVEDO, R.; MOORE, P. F.; RIDEOUT, B. A.; COOPER, M. D.; PEDERSEN, N. C. Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 4, n. 3, p. 219-227, 1991.
- BARR, M. C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 144-153, Aug, 1996.
- BARR, M. C.; BILLAUD, J. N.; SELWAY, D. R.; HUITRON-RESENDIZ, S.; OSBORN, K. G.; HENRIKSEN, S. J.; PHILLIPS, T. R. Effects of multiple acute morphine exposures on feline immunodeficiency virus disease progression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 3, p. 725-732, Sep, 2000a.

- BARR, M. C.; HUITRON-RESENDIZ, S.; SELWAY, D. R.; HENRIKSEN, S. J.; PHILLIPS, T. R. Exogenous glucocorticoids alter parameters of early feline immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 576-586, Feb, 2000b.
- BARR, M. C.; POUGH, M. B.; JACOBSON, R. H.; SCOTT, F. W. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1377-1381, Nov, 1991.
- BARR, M. C.; ZOU, L.; LONG, F.; HOOSE, W. A.; AVERY, R. J. Proviral organization and sequence analysis of feline immunodeficiency virus isolated from a Pallas' cat. **Virology**, v. 228, n. 1, p. 84-91, Feb, 1997.
- BASTIEN, P.; CHABBERT, E.; LACHAUD, L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2272, May, 2003.
- BEATTY, J. A.; WILLETT, B. J.; GAULT, E. A.; JARRETT, O. A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 6199-6206, Sep, 1996.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 87-112, Jan, 1995.
- BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 9, p. 753-757, Sep, 2004.
- BORST, A.; BOX, A. T.; FLUIT, A. C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 289-299, Apr, 2004.
- BRUNNER, D.; PEDERSEN, N. C. Infection of peritoneal macrophages in vitro and in vivo with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 12, p. 5483-5488, Dec, 1989.
- CALLANAN, J. J.; JONES, B. A.; IRVINE, J.; WILLETT, B. J.; MCCANDLISH, I. A.; JARRETT, O. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 3, p. 264-272, May, 1996.
- CARPENTER, M. A.; BROWN, E. W.; CULVER, M.; JOHNSON, W. E.; PECON-SLATTERY, J.; BROUSSET, D.; O'BRIEN, S. J. Genetic and phylogenetic divergence of feline immunodeficiency virus in the puma (*Puma concolor*). **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 6682-6693, Oct, 1996.

CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 953-956, Nov, 2006.

CRAWFORD, P. C.; LEVY, J. K. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** v. 37, n. 2, p. 335-350, Mar, 2007.

DANIEL, A. G. T.; HAIPEK, K.; RECHE JR., A. Prevalence of infection by feline immunodeficiency virus (FIV) and/or the feline leukemia virus (FeLV) in cats with chronic gingivitis: **Journal Veterinary Research**, v. 10, p. 42-54, 2006. Disponivel em: <<http://users.comcen.con.au/~journals/jvet196a.htm>>. Acesso em: 07.08.2010.

DE MARI, K.; MAYNARD, L.; SANQUER, A.; LEBREUX, B.; EUN, H. M. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 4, p. 477-482, Jul-Aug, 2004.

DE PARSEVAL, A.; CHATTERJI, U.; MORRIS, G.; SUN, P.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H. Structural mapping of CD134 residues critical for interaction with feline immunodeficiency virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-66, Jan, 2005.

DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5169, Aug, 1996.

DEL FIERRO, G. M.; MEERS, J.; THOMAS, J.; CHADWICK, B.; PARK, H. S.; ROBINSON, W. F. Quantification of lymphadenopathy in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in domestic cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1-2, p. 3-12, May, 1995.

DUNHAM, S. P.; BRUCE, J.; MACKAY, S.; GOLDER, M.; JARRETT, O.; NEIL, J. C. Limited efficacy of an inactivated feline immunodeficiency virus vaccine. **Veterinary Record**, v. 158, p. 561-562, 2006.

EGBERINK, H. F.; DE CLERCQ, E.; VAN VLIET, A. L.; BALZARINI, J.; BRIDGER, G. J.; HENSON, G.; HORZINEK, M. C.; SCHOLS, D. Bicyclams, selective antagonists of the human chemokine receptor CXCR4, potently inhibit feline immunodeficiency virus replication. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6346-6352, Aug, 1999.

ELYAR, J. S.; TELLIER, M. C.; SOOS, J. M.; YAMAMOTO, J. K. Perspectives on FIV vaccine development. **Vaccine**, v. 15, n. 12-13, p. 1437-1444, Aug-Sep, 1997.

ENGLISH, R. V.; JOHNSON, C. M.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. B. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5175-5186, Sep, 1993.

FEVEREIRO, M.; RONEKER, C.; LAUFS, A.; TAVARES, L.; DE NORONHA, F. Characterization of two monoclonal antibodies against feline immunodeficiency virus gag gene products and their application in an assay to evaluate neutralizing antibody activity. **Journal of General Virology**, v. 72, Pt. 3, p. 617-622, Mar, 1991.

FLYNN, J. N.; CANNON, C. A.; LAWRENCE, C. E.; JARRETT, O. Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Immunology**, v. 81, n. 4, p. 626-630, Apr, 1994.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. **Veterinary Journal**, v. 155, n. 2, p. 123-137, Mar, 1998.

HARTMANN, K.; DONATH, A.; BEER, B.; EGBERINK, H. F.; HORZINEK, M. C.; LUTZ, H.; HOFFMANN-FEZER, G.; THUM, I.; THEFELD, S. Use of two virustatic (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 167-175, Dec, 1992.

HARTMANN, K.; FERK, G.; NORTH, T. W.; PEDERSEN, N. C. Toxicity associated with high dosage 9-[(2R,5R-2,5-dihydro-5-phosphomethoxy)-2-furanyl]adenine therapy off attempts to abort early FIV infection. **Antiviral Research**, v. 36, n. 1, p. 11-25, Sep, 1997.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal of Virology**, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, Mar, 2007.

HEIN, A.; MARTIN, J. P.; KOEHREN, F.; BINGEN, A.; DORRIES, R. In vivo infection of ramified microglia from adult cat central nervous system by feline immunodeficiency virus. **Virology**, v. 268, n. 2, p. 420-429, Mar, 2000.

HENRIKSEN, S. J.; PROSPERO-GARCIA, O.; PHILLIPS, T. R.; FOX, H. S.; BLOOM, F. E.; ELDER, J. H. Feline immunodeficiency virus as a model for study of lentivirus infection of the central nervous system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 202, p. 167-186, 1995.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 8, p. 302-303, Aug, 2007.

HOSIE, M. J.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 575-584, Jul, 2009.

HUGHES, M. S.; BALL, N. W.; LOVE, D. N.; CANFIELD, P. J.; WIGNEY, D. I.; DAWSON, D.; DAVIS, P. E.; MALIK, R. Disseminated Mycobacterium genavense infection in a FIV-positive cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 1, n. 1, p. 23-29, Mar, 1999.

HUISMAN, W.; SCHRAUWEN, E. J.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. Intrahost evolution of envelope glycoprotein and OrfA sequences after experimental infection of cats with a molecular clone and a biological isolate of feline immunodeficiency virus. **Virus Research**, v. 137, n. 1, p. 24-32, Oct, 2008.

INOSHIMA, Y.; IKEDA, Y.; KOHMOTO, M.; PECORARO, M. R.; SHIMOJIMA, M.; SHIMOJIMA, Y.; INADA, G.; KAWAGUCHI, Y.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; MIKAMI, T. Persistence of high virus neutralizing antibody titers in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 58, n. 9, p. 925-927, Sep, 1996.

JORDAN, H. L.; HOWARD, J.; BARR, M. C.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; LEVY, J. K.; TOMPKINS, W. A. Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 14, n. 12, p. 1087-1092, Aug 10, 1998a.

JORDAN, H. L.; HOWARD, J. G.; BUCCI, J. G.; BUTTERWORTH, J. L.; ENGLISH, R.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 1-2, p. 341-357, Dec, 1998b.

JOSHI, A.; GARG, H.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Preferential feline immunodeficiency virus (FIV) infection of CD4+ CD25+ T-regulatory cells correlates both with surface expression of CXCR4 and activation of FIV long terminal repeat binding cellular transcriptional factors. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 4965-4976, Apr, 2005.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3639-3646, Jun, 1995.

KANN, R.; SEDDON, J.; KYAW-TANNER, M.; MEERS, J. Co-infection with different subtypes of feline immunodeficiency virus can complicate subtype assignment by phylogenetic analysis. **Archives of Virology**, v. 152, n. 6, p. 1187-1193, 2007.

KURITZKES, D. R. HIV resistance: frequency, testing, mechanisms. **Topics in HIV Medicine**, v. 15, n. 5, p. 150-154, Nov-Dec, 2007.

LARA, V. M.; TANIWAKIII, S. A.; ARAÚJO JR, J. P. Phylogenetic characterization of feline immunodeficiency virus (FIV) isolates from the state of São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 467-470, Nov, 2007.

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 10, p. 1558-1561, Nov, 2004.

LEVY, J. K.; SNYDER, P. S.; TAVERES, L. M.; HOOKS, J. L.; PEGELOW, M. J.; SLATER, M. R.; HUGHES, K. L.; SALUTE, M. E. Prevalence and risk factors for heartworm infection in cats from northern Florida. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 6, p. 533-537, Nov-Dec, 2003.

MARTINS, A. N.; MEDEIROS, S. O.; SIMONETTI, J. P.; SCHATZMAYR, H. G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R. M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naive cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7863-7874, Aug, 2008.

MATSUMOTO, H.; TAKEMURA, N.; SAKO, T.; KOYAMA, H.; MOTOYOSHI, S.; INADA, Y. Serum concentration of circulating immune complexes in cats infected with feline immunodeficiency virus detected by immune adherence hemagglutination method. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 5, p. 395-396, May, 1997.

MATTEUCCI, D.; BALDINOTTI, F.; MAZZETTI, P.; PISTELLO, M.; BANDECCHI, P.; GHILARDUCCI, R.; POLI, A.; TOZZINI, F.; BENDINELLI, M. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 494-501, Mar, 1993.

MCMICHAEL, A. J. HIV vaccines. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 227-255, 2006.

MIYAZAWA, T.; FURUYA, T.; ITAGAKI, S.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 108, n. 1-2, p. 131-135, 1989.

MOENCH, T. R.; WHALEY, K. J.; MANDRELL, T. D.; BISHOP, B. D.; WITT, C. J.; CONE, R. A. The cat/feline immunodeficiency virus model for transmucosal transmission of AIDS: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum. **Aids**, v. 7, n. 6, p. 797-802, Jun, 1993.

O'CONNOR, T. P., JR.; TANGUAY, S.; STEINMAN, R.; SMITH, R.; BARR, M. C.; YAMAMOTO, J. K.; PEDERSEN, N. C.; ANDERSEN, P. R.; TONELLI, Q. J. Development and evaluation of immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (feline immunodeficiency virus). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 474-479, Mar, 1989.

O'NEIL, L. L.; BURKHARD, M. J.; DIEHL, L. J.; HOOVER, E. A. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 11, n. 1, p. 171-182, Jan, 1995.

OLMSTED, R. A.; HIRSCH, V. M.; PURCELL, R. H.; JOHNSON, P. R. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 20, p. 8088-8092, Oct, 1989.

OLMSTED, R. A.; LANGLEY, R.; ROELKE, M. E.; GOEKEN, R. M.; ADGER-JOHNSON, D.; GOFF, J. P.; ALBERT, J. P.; PACKER, C.; LAURENSEN, M. K.; CARO, T. M.; SCHEEPERS, L.; WILDT, D. E.; BUSH, M.; MARTELSON, J. S.; O'BRIEN, S. J. Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. **Journal Virology**, v. 66, n. 10, p. 6008-6018, Oct, 1992.

PECORARO, M. R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 77, Pt. 9, p. 2031-2035, Sep, 1996.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 4790, p. 790-793, Feb, 1987.

PEDERSEN, N. C.; NORTH, T. W.; RIGG, R.; READING, C.; HIGGINS, J.; LEUTENEGGER, C.; HENDERSON, G. L. 16alpha-Bromo-epiandrosterone therapy modulates experimental feline immunodeficiency virus viremia: initial enhancement leading to long-term suppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, n. 3-4, p. 133-148, Aug, 2003.

PEDERSEN, N. C.; YAMAMOTO, J. K.; ISHIDA, T.; HANSEN, H. Feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 21, n. 1, p. 111-129, May, 1989.

PHILLIPS, K.; ARAI, M.; TANABE, T.; RASKIN, R.; VOLZ, M.; UHL, E. W.; YAMAMOTO, J. K. FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF treatment which results in anti-G-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 3-4, p. 357-371, Dec, 2005.

PHILLIPS, T. R.; PROSPERO-GARCIA, O.; WHEELER, D. W.; WAGAMAN, P. C.; LERNER, D. L.; FOX, H. S.; WHALEN, L. R.; BLOOM, F. E.; ELDER, J. H.; HENRIKSEN, S. J. Neurologic dysfunctions caused by a molecular clone of feline immunodeficiency virus, FIV-PPR. **Journal Neurovirology**, v. 2, n. 6, p. 388-396, Dec, 1996.

PISTELLO, M.; CAMMAROTA, G.; NICOLETTI, E.; MATTEUCCI, D.; CURCIO, M.; DEL MAURO, D.; BENDINELLI, M. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. **The Journal of General Virology**, v. 78, Pt. 9, p. 2247-2257, Sep, 1997.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MATTEUCCI, D.; BALDINOTTI, F.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; BARSOTTI, P.; BENDINELLI, M. Renal involvement in feline immunodeficiency virus infection: p24 antigen detection, virus isolation and PCR analysis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1-2, p. 13-20, May, 1995b.

POLI, A.; FALCONE, M. L.; BIGALLI, L.; MASSI, C.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LOMBARDI, S.; BENDINELLI, M.; LUTZ, H. Circulating immune complexes and analysis of renal immune deposits in feline immunodeficiency virus-infected cats. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 101, n. 2, p. 254-258, Aug, 1995a.

PROSPERO-GARCIA, O.; HEROLD, N.; PHILLIPS, T. R.; ELDER, J. H.; BLOOM, F. E.; HENRIKSEN, S. J. Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12947-12951, Dec, 1994.

PU, R.; OKADA, S.; LITTLE, E. R.; XU, B.; STOFFS, W. V.; YAMAMOTO, J. K. Protection of neonatal kittens against feline immunodeficiency virus infection with passive maternal antiviral antibodies. **Aids**, v. 9, n. 3, p. 235-242, Mar, 1995.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M. K. **Estudo clínico da síndrome de imunodeficiência adquirida dos felinos em felinos domésticos de São Paulo**: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1993.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 34, p. 152-155, 1997.

REGGETI, F.; ACKERLEY, C.; BIENZLE, D. CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells. **The Journal of General Virology**, v. 89, Pt. 1, p. 277-287, Jan, 2008.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. **The Journal of General Virology**, v. 85, Pt. 7, p. 1843-1852, Jul, 2004.

RIMMELZWAAN, G. F.; SIEBELINK, K. H.; BROOS, H.; DROST, G. A.; WEIJER, K.; VAN HERWIJNEN, R.; OSTERHAUS, A. D. gag- and env-specific serum antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Microbiology**, v. 39, n. 1-2, p. 153-165, Mar, 1994.

RIONDATO, F.; GIANELLA, P.; GUGLIELMINO, R.; CAGNASSO, A.; BO, S. Effects of interferon alpha (INF-alpha) therapy on peripheral blood lymphocyte subsets from FIV and FeLV naturally infected cats. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 429-432, Sep, 2003.

ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1171-1173, Nov, 1988.

SELLON, R. K.; JORDAN, H. L.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Feline immunodeficiency virus can be experimentally transmitted via milk during acute maternal infection. **Journal Virology**, v. 68, n. 5, p. 3380-3385, May, 1994.

SHELTON, G. H.; GRANT, C. K.; LINENBERGER, M. L.; ABKOWITZ, J. L. Severe neutropenia associated with griseofulvin therapy in cats with feline immunodeficiency virus infection. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 4, n. 6, p. 317-319, Nov-Dec, 1990a.

SHELTON, G. H.; GRANT, C. K.; COTTER, S. M.; GARDNER, M. B.; HARDY, W. D., JR.; DIGIACOMO, R. F. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 3, n. 6, p. 623-630, 1990b.

SHIMOJIMA, M.; MIYAZAWA, T.; IKEDA, Y.; MCMONAGLE, E. L.; HAINING, H.; AKASHI, H.; TAKEUCHI, Y.; HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1192-1195, Feb, 2004.

SIEBELINK, K. H.; KARLAS, J. A.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D.; BOSCH, M. L. A determinant of feline immunodeficiency virus involved in Crandell feline kidney cell tropism. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1-2, p. 61-69, May, 1995.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994a.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994b.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Epidemiological study of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic cats in the city of Rio de Janeiro **Clínica Veterinária**, v. 36, p. 14-21, 2002.

TANABE, T.; YAMAMOTO, J. K. Feline immunodeficiency virus lacks sensitivity to the antiviral activity of feline IFN-gamma. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, n. 12, p. 1039-1046, Dec, 2001.

TEIXEIRA, B. M.; LOGAN, N.; CRUZ, J. C. M.; BRANDÃO, P. E.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J.; HAGIWARA, M. K. CD134 and its interaction with Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20., 2009, Brasília, DF. [Anais...], 2009.

TEIXEIRA, B. M.; LOGAN, N.; CRUZ, J. C. M.; REIS, J. K. P.; BRANDÃO, P. E.; HAGIWARA, M. K.; HOSIE, M. J. Analysis of the genetic diversity of Brazilian isolate of feline immunodeficiency virus. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 19., 2008, Caxambu, MG. [Anais...], 2008.

TEIXEIRA, B. M.; LOGAN, N.; CRUZ, J. C.; REIS, J. K.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; HAGIWARA, M. K.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 379-384, Jan, 2010.

TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, Aug, 2007.

TENORIO, A. P.; FRANTI, C. E.; MADEWELL, B. R.; PEDERSEN, N. C. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 29, n. 1-2, p. 1-14, Aug, 1991.

TOMPKINS, W. A. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 8, p. 817-828, Aug, 1999.

UHL, E. W.; HEATON-JONES, T. G.; PU, R.; YAMAMOTO, J. K. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 90, n. 3-4, p. 113-132, Dec, 2002.

WEAVER, E. A.; COLLISSON, E. W.; SLATER, M.; ZHU, G. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal Virology**, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, Feb, 2004.

WEISS, R. A. How does HIV cause AIDS? **Science**, v. 260, n. 5112, p. 1273-1279, May, 1993.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 56-64, May, 2008.

WILLETT, B.; HOSIE, M.; SHAW, A.; NEIL, J. Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. **The Journal of General Virology**, v. 78, Pt. 3, p. 611-618, Mar, 1997.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 213-220, Jan, 1989.

YAMAMOTO, J. K.; PU, R.; SATO, E.; HOHDATSU, T. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. **Aids**, v. 21, n. 5, p. 547-563, Mar, 2007.

CAPÍTULO III

FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND ITS RECEPTORS

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus associated with an AIDS-like syndrome in the domestic cat. The hallmark of the infection is a gradual depletion of CD4⁺ helper T lymphocytes. The FIV enter cells by sequential interaction between its envelope glycoprotein (ENV) and the primary receptors, CD 134, and subsequently with the co-receptor the chemokine receptors CXCR4. The expression of those receptors is restricted to activated cells. The FIV possesses a broad tropism for CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes, B lymphocytes and monocyte-derived macrophages. CD4⁺ cell has the greatest provirus burden during the acute phase of infection but during the chronic phase, asymptomatic stage, B cells bears the major FIV provirus. This change could be the result of the different way that the ENV interacts with its receptors. This review is a brief overview of the interaction between FIV and its receptors. The molecular mechanisms of this relation and the viral cell tropism with disease progression not only did are important to development of vaccine approaches and therapeutic interventions but also to the understanding of pathogenesis of lentiviruses.

Keywords: Feline immunodeficiency virus. Receptor. CD134. CXCR4.

1 INTRODUCTION

Feline immunodeficiency virus (FIV), an important viral pathogen worldwide in the domestic cat, causes a slow progressive degeneration of immune functions that eventually leads to a disease comparable to acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in humans. FIV is unique among the nonprimate lentiviruses because in its natural host species, the domestic cat, it induces a disease similar to AIDS in humans induced by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), which is characterized by a progressive depletion of CD4⁺ T lymphocytes (PEDERSEN et al., 1987; HOSIE; ROBERTSON; JARRETT, 1989). The infection causes a variable immunodeficiency syndrome characterized by recurrent gingivitis-stomatitis, cachexia, wasting, neurology, and an increased incidence of tumor development (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1989; ACKLEY et al., 1990; BEATTY et al., 1998). Distinctly, the ungulate lentiviruses cause diseases reminiscent of chronic inflammatory conditions while infection the bovine lentivirus seems to be inapparent (WILLETT; HOSIE, 2008). Thus FIV has been studied widely as both an important veterinary pathogen and an animal model for HIV/AIDS.

On the basis of the analysis of envelope glycoprotein (ENV), third to fifth variable regions, V3-V5, FIV has been classified into five subtypes (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996) a number that should be expected to increase as further studies reveal additional diversity. Recent studies identified distinct groups of FIV isolates from United States and New Zealand (WEAVER et al., 2004; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). Subtype-specific disagreements, *in vivo*, in pathogenicity have been inconsistently identified, but *in vitro* cell tropism and replication efficiency differ (REGGETI; ACKERLEY; BIENZLE, 2008).

Progression of the disease resemble a pattern typical of that observed with primate lentiviruses, in the beginning a relatively short acute phase showed by an increment of the viral loads, low-grade fever, weight loss, lymphadenopathy, and neutropenia. The acute phase is followed by an asymptomatic period, that could be years, denoted by an antiviral immune responses, lower viral titers, a gradual decline in CD4⁺ cells, and few clinical symptoms. The terminal phase has an immunologic decompensation, a rise of plasma viral load, and clinical symptoms of immunodeficiency with opportunistic infections (ENGLISH et al., 1994; HOSIE; BEATTY, 2007).

Although the drop of the CD4+ cells is the mark of FIV infection, the virus has been shown to infect a variety of cell types in their respective hosts including CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, B lymphocytes, cells of neuronal lineage and monocyte/macrophage lineage (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996). Joshi et al. (2005) have characterized feline CD4⁺ CD25⁺ T regulatory (Treg) cells with the ability to support FIV replication. Recently, Reggeti, Ackerley and Bienzle (2008) have shown that feline dendritic cells (DCs) express specific viral receptors and are infected productively by FIV.

The specificity of the virus-receptors interaction is the earliest determinant of cell tropism and a decisive factor in the pathogenesis of viral disease (WILLETT et al., 2006a). Despite the similarities in the clinical disease and pathogenesis of FIV and HIV-1, these viruses use distinct receptors and have different in vivo target cell ranges. The primate lentiviruses HIV and simian immunodeficiency virus (SIV) stick initially to CD4, targeting the virus to helper T cells, which produces conformational rearrangement in envelope, gp 120. This conformational alteration exposes a highly conserved site for interaction with a molecule from the seven transmembrane domain (7TM) superfamily, chemokine receptors CCR5 or CXCR4, and fusion of gp41 with the host-cell membrane (KWONG et al., 1998; DOMS; MOORE, 2000).

Partial explanation of the process of infection with FIV was provided by discovery that all primary isolates and laboratory strains of virus use CXCR4 as a co-receptor for infection. The data suggest that the usage of chemokine receptors for infection may be a conserved property of lentiviruses and may play a decisive role in the immunodeficiency associated with lentivirus infection (WILLETT et al., 1997). Expression of the CXCR4 is the limiting factor in the productive infection of cells by FIV and that the standard of CXCR4 expression and the relative affinity of surface glycoprotein, SU, for CXCR4 control the amount of virus spread and cytopathogenicity (DE PARSEVAL et al., 2004).

The FIV has a same kind of pattern of receptor usage than HIV-1; however, CD 134 rather than CD4 is the beginning binding partner, and subsequent interaction with CXCR4 permits cells entry (SHIMOJIMA et al., 2004). CD134 was primary described as MRC OX-40, an antigen expressed on activated rat CD4⁺ T belonging to tumor necrosis factor receptor/nerve growth factor receptor (TNFR/NGFR) superfamily (PATERSON et al., 1987; MALLETT; FOSSUM; BARCLAY, 1990). The SU of FIV, gp95, binds to activated cells expressing CD134, the 43-kDa receptor. Pre-treatment of virus with soluble CD134 facilitates infection of CD134⁻ CXCR4⁺ cells, showing that the binding receptor changes the conformation of SU to promote intense affinity binding to CXCR4 (DE PARSEVAL et al.,

2005). Studies have indicated that FIV infection of certain cells may occur solely mediated via CXCR4 if expression of the chemokine receptor is sufficiently high (DE PARSEVAL; ELDER, 2001).

Ectopic expression of CD134 allows feline cells permissive for infection with all strains of FIV tested from different geographical origin and phylogenetic subtype. News Studies revealed differential utilization of feline CD134 by FIV. Primary isolates of FIV could be put on at least two groups as evidence on their interactions with CD134. The expression of first cysteine-rich domain (CRD1) of feline CD134 alone is enough to confer nearly optimal receptor function for infection with strains such as PPR, subtype A, and B2542, subtype B, although pathogenic primary strains of virus, such as GL8, subtype A, GPGammer, subtype C, and NCSU1, subtype B, need extra determinants, the second cysteine-rich domain, CRD2, in the CD134 and at that rate the CD134 form a functional receptor (WILLETT et al., 2006a,b).

Other determinants within the viral envelope glycoprotein could contribute to virus tropism. Sequence variations and conformational changes within the ENV are responsible for determining receptor usage to FIV (LERNER; ELDER, 2000). Chemokine receptor tropism has been linked to sequence variations of envelope surface protein in the primate lentiviruses (CHO et al., 1998). That same region in FIV is a major neutralization domain and also an important determinant for cell tropism (SIEBELINK et al., 1995; VERSCHOOR et al., 1995; VAHLENKAMP et al., 1997). The mutation in the V3 is sufficient to convert a non-CRFK tropic virus into a CRFK-tropic virus (VERSCHOOR et al., 1995). Other domains of SU distinct from V3 are also important determinants and/or codeterminants of cytotoxicity to HIV 1 (PALMER et al., 1996). Recent paper has showed that a single glycosylation site ablated in the envelope of the FIV, first and second variable domains (V1V2), can modulate the ENV-CD134 interaction. The removal of a single site for N-linked glycosylation is sufficient to swap strains from complex to a minimal interaction (WILLETT et al., 2008).

Some strains of primate lentiviruses can get interaction directly with the co-receptors (KOLCHINSKY; KIPRILOV; SODROSKI, 2001). These CD4-independent strains may be more sensitive to neutralising, the chemokine receptor binding site could be more exposed to antibodies, but they would have a broader cell tropism *in vivo* where CD4 expression could be low, like central nervous system (CNS) (HOFFMAN et al., 1999; KOLCHINSKY; KIPRILOV; SODROSKI, 2001; MARTIN; LABRANCHE; GONZALEZ-SCARANO, 2001).

In the FIV infection the provirus levels are higher in CD4⁺ T cells during acute phase of infection, while B cells contain the majority of provirus during the chronic phase (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996). Possibly with disease progression, FIV may either lose its dependence of bind to CD 134 or interact more efficiently with CXCR4. The link between the nature of the ENV-CD134 interaction and the broadening of viral cell tropism with disease progression will be an important avenue of future research (WILLETT et al., 2006a). The virus tropism may be influenced by several factors, including the affinity of the viral envelope for the receptors, the level of expression of the receptors, the conformational heterogeneity of the viral envelope as well as the receptors, and/or presence of attachment cofactors such as heparin sulphate proteoglycans, HSPGs, and a specific C-type lectin expressed on dendritic cells, DC-SIGN (DE PARSEVAL et al., 2004).

Recently, a paper has revealed that CXCR4 and CD134 genes expression in all lymphocytes, monocyte-derived cells and dendritic cells. The CXCR4 gene expression has downregulation after mitogen stimulation. Differences in CD134 gene expression showed more pronounced between different cell types, consistent with predominant expression on CD4+ T cells (REGGETI; ACKERLEY; BIENZLE, 2008).

In the interaction of the virus-receptors is important to do regard of the host condition, receptors expression, strains involved and its genetic standard and environment condition. The cells infections by lentiviruses involve specific interactions between the viral envelope and yours receptors resulting in a conformational change that enables fusion of the viral and cellular membranes. Further dissection this interaction should be crucial to understanding of FIV infection, pathogenesis and clinical signs seen in the cats.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (the São Paulo State research funding foundation) and CNPq (Brazil's National Research Council).

REFERENCES

- ACKLEY, C. D.; YAMAMOTO, J. K.; LEVY, N.; PEDERSEN, N. C.; COOPER, M. D. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 64, n. 11, p. 5652-5655, Nov, 1990.
- BEATTY, J. A.; LAWRENCE, C. E.; CALLANAN, J. J.; GRANT, C. K.; GAULT, E. A.; NEIL, J. C.; JARRETT, O. Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumourigenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, n. 2-4, p. 309-322, Oct, 1998.
- CHO, M. W.; LEE, M. K.; CARNEY, M. C.; BERSON, J. F.; DOMS, R. W.; MARTIN, M. A. Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. **Journal Virology**, v. 72, n. 3, p. 2509-2515, Mar, 1998.
- DE PARSEVAL, A.; CHATTERJI, U.; MORRIS, G.; SUN, P.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H. Structural mapping of CD134 residues critical for interaction with feline immunodeficiency virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-66, Jan, 2005.
- DE PARSEVAL, A.; ELDER, J. H. Binding of recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoprotein to feline cells: role of CXCR4, cell-surface heparans, and an unidentified non-CXCR4 receptor. **Journal Virology**, v. 75, n. 10, p. 4528-4539, May, 2001.
- DE PARSEVAL, A.; NGO, S.; SUN, P.; ELDER, J. H. Factors that increase the effective concentration of CXCR4 dictate feline immunodeficiency virus tropism and kinetics of replication. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9132-9143, Sep, 2004.
- DE PARSEVAL, A.; CHATTERJI, U.; MORRIS, G.; SUN, P.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H. Structural mapping of CD134 residues critical for interaction with feline immunodeficiency virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-66, Jan, 2005.
- DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5169, Aug, 1996.
- DOMS, R. W.; MOORE, J. P. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 2, p. F9-14, Oct, 2000.
- ENGLISH, R. V.; JOHNSON, C. M.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. B. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5175-5186, Sep, 1993.
- ENGLISH, R. V.; NELSON, P.; JOHNSON, C. M.; NASISSE, M.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 3, p. 543-552, Sep, 1994.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal Virology**, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, Mar, 2007.

HOFFMAN, T. L.; LABRANCHE, C. C.; ZHANG, W.; CANZIANI, G.; ROBINSON, J.; CHAIKEN, I.; HOXIE, J. A.; DOMS, R. W. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6359-6364, May, 1999.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 8, p. 302-303, Aug, 2007.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 11, p. 293-297, Sep, 1989.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3639-3646, Jun, 1995.

KOLCHINSKY, P.; KIPRILOV, E.; SODROSKI, J. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. **Journal Virology**, v. 75, n. 5, p. 2041-2050, Mar, 2001.

KWONG, P. D.; WYATT, R.; ROBINSON, J.; SWEET, R. W.; SODROSKI, J.; HENDRICKSON, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 648-659, Jun, 1998.

LERNER, D. L.; ELDER, J. H. Expanded host cell tropism and cytopathic properties of feline immunodeficiency virus strain PPR subsequent to passage through interleukin-2-independent T cells. **Journal Virology**, v. 74, n. 4, p. 1854-1863, Feb, 2000.

MALLETT, S.; FOSSUM, S.; BARCLAY, A. N. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. **The Embo Journal**, v. 9, n. 4, p. 1063-1068, Apr, 1990.

MARTIN, J.; LABRANCHE, C. C.; GONZALEZ-SCARANO, F. Differential CD4/CCR5 utilization, gp120 conformation, and neutralization sensitivity between envelopes from a microglia-adapted human immunodeficiency virus type 1 and its parental isolate. **Journal Virology**, v. 75, n. 8, p. 3568-3580, Apr, 2001.

PALMER, C.; BALFE, P.; FOX, D.; MAY, J. C.; FREDERIKSSON, R.; FENYO, E. M.; MCKEATING, J. A. Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. **Virology**, v. 220, n. 2, p. 436-449, Jun, 1996.

PATERSON, D. J.; JEFFERIES, W. A.; GREEN, J. R.; BRANDON, M. R.; CORTHESY, P.; PUKLAVEC, M.; WILLIAMS, A. F. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. **Molecular Immunology**, v. 24, n. 12, p. 1281-1290, Dec, 1987.

PECORARO, M. R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 77, Pt. 9, p. 2031-2035, Sep, 1996.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 4790, p. 790-793, Feb, 1987.

REGGETI, F.; ACKERLEY, C.; BIENZLE, D. CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells. **The Journal of General Virology**, v. 89, Pt. 1, p. 277-287, Jan, 2008.

SHIMOJIMA, M.; MIYAZAWA, T.; IKEDA, Y.; MCMONAGLE, E. L.; HAINING, H.; AKASHI, H.; TAKEUCHI, Y.; HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1192-1195, Feb, 2004.

SIEBELINK, K. H.; KARLAS, J. A.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D.; BOSCH, M. L. A determinant of feline immunodeficiency virus involved in Crandell feline kidney cell tropism. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1-2, p. 61-69, May, 1995.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994.

VAHLENKAMP, T. W.; VERSCHOOR, E. J.; SCHUURMAN, N. N.; VAN VLIET, A. L.; HORZINEK, M. C.; EGGERINK, H. F.; DE RONDE, A. A single amino acid substitution in the transmembrane envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus alters cellular tropism. **Journal of Virology**, v. 71, n. 9, p. 7132-7135, Sep, 1997.

VERSCHOOR, E. J.; BOVEN, L. A.; BLAAK, H.; VAN VLIET, A. L.; HORZINEK, M. C.; DE RONDE, A. A single mutation within the V3 envelope neutralization domain of feline immunodeficiency virus determines its tropism for CRFK cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4752-4757, Aug, 1995.

WEAVER, E. A.; COLLISON, E. W.; SLATER, M.; ZHU, G. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, Feb, 2004.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 56-64, May, 2008.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; BONCI, F.; PISTELLO, M.; HOSIE, M. J. Mapping the domains of CD134 as a functional receptor for feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7744-7747, Aug, 2006b.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; LOGAN, N.; SAMMAN, A.; HOSIE, M. J. A single site for N-linked glycosylation in the envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus modulates the virus-receptor interaction. **Retrovirology**, v. 5, p. 77, 2008.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; RIDHA, S.; HOSIE, M. J. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3386-3394, Apr, 2006a.

WILLETT, B. J.; PICARD, L.; HOSIE, M. J.; TURNER, J. D.; ADEMA, K.; CLAPHAM, P. R. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. **Journal of Virology**, v. 71, n. 9, p. 6407-6415, Sep, 1997.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 213-220, Jan, 1989.

CAPÍTULO IV

INTRAHOST GENETIC DIVERSITY OF BRAZILIAN ISOLATE OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

ABSTRACT

The lentivirus feline immunodeficiency virus (FIV) is an important viral pathogen of the domestic cat worldwide. We isolated FIV from an adult male domestic cat, originating from an open shelter in Minas Gerais, Brazil. The virus was isolated from PBMC following co-cultivation with the feline T-lymphoblastoid cell line MYA-1. Full-length viral envelope glycoprotein (*env*) genes were amplified from the replication-competent virus. All amplified *env* gene products were cloned directly into pGL8_{MYA}. The nucleic acid sequence of three independent clones were determined, compared with previously described isolates and submitted to GeneBank. The sequences of all of the Brazilian virus clones were distinct and phylogenetic analysis revealed that they belong to subtype B.

Keywords: Feline immunodeficiency virus. Intrahost Genetic Diversity.

1 INTRODUCTION

Feline immunodeficiency virus (FIV), originally isolated in the United States in 1986 from a cat with chronic opportunistic infections (PEDERSEN et al., 1987), is a member of the *Retroviridae* family, genus lentivirus. FIV-infected cats can exhibit illnesses including gingivitis, stomatitis, lymphoma, neurological disorders and wasting (PEDERSEN et al., 1987; HOSIE; ROBERTSON; JARRETT, 1989; RYAN et al., 2005). The hallmark of FIV infection is a progressive reduction in the number of circulating CD4⁺ lymphocytes which ultimately results in an impairment of immunity similar to AIDS caused by human immunodeficiency virus (HIV) (TORTEN et al., 1991). FIV is both a significant pathogen of domestic cats (PEDERSEN et al., 1987) and a widely used model to investigate HIV pathogenesis and approaches to AIDS vaccination (ELDER et al., 1998).

The viral genome is made up of three major genes and several smaller regulatory genes. Like other lentiviruses, FIV exhibits extensive genetic variation (ROBERTS; BEBENEK; KUNKEL, 1988; KANN et al., 2007). The *pol* and *gag* encode viral enzymes and core proteins respectively, and are relatively highly conserved. The *env* gene encodes surface and transmembrane glycoproteins and is highly variable (OLMSTED et al., 1989; TALBOTT et al., 1989; GREENE et al., 1993). Within the *env* gene, nine variable regions have been defined, separated by blocks that are more conserved (PANCINO et al., 1993). On the basis of envelope glycoprotein variable regions 3-5, FIV has been classified into five subtypes (SODORA et al., 1994a; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996), a number that can be expected to increase as further studies reveal additional diversity. Recent studies identified distinct groups of FIV isolates from United States, Texas, and New Zealand (WEAVER et al., 2004; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). Although genetic subtyping, in general, is obtained when nucleotide sequences from *gag* regions are analysed (HOHDATSU et al., 1998; DUARTE; TAVARES, 2006), the high variation of the *env* region makes it the preferred region for subtyping (KANN et al., 2007). The *env* region contains determinants important for cell tropism, cytopathogenicity, and infectivity and prominent immunoreactive domains (SIEBELINK et al., 1992; LOMBARDI; BENDINELLI; GARZELLI, 1993; PANCINO et al., 1993).

The rapid evolution of lentiviruses within an infected individual results in the formation of a viral quasispecies, a phenomenon well documented in HIV infection (ROBERTS; BEBENEK; KUNKEL, 1988; GOODNOW et al., 1989). The existence of

multiple variants, quasispecies, of FIV has been reported as well (SODORA et al., 1994b; KYAW-TANNER; ROBINSON, 1996). Information on intrahost sequence variation is sparse and limited (HOSIE et al., 2002; HUISMAN et al., 2008). Without molecular cloning, the existence of minor quasispecies would not have been detected (KYAW-TANNER; ROBINSON, 1996).

FIV infection is prevalent worldwide (YAMAMOTO et al., 2007). Preliminary studies carried out suggested that FIV infection is widespread in the domestic cat population of Brazil (RECHE JR; HAGIWARA; LUCAS, 1997; CALDAS et al., 2000; SOUZA; TEIXEIRA; GRAÇA, 2002; CAXITO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; MARTINS et al., 2008). Prevalence rates of FIV infection in Brazil have not been well evaluated and regional variations are largely unexplored. Expanded surveys of Brazilian isolates are required to determine whether FIV isolates in Brazil have evolved within a single subtype. Preliminary works suggested that subtype B was present in the Brazil domestic cat population (CAXITO et al., 2006; LARA; TANIWAKIII; ARAÚJO JR, 2007; MARTINS et al., 2008). Identification of circulating subtypes is essential to develop strategies for molecular diagnosis, since the genetic diversity is high (REGGETI; BIENZLE, 2004). In this study, strain of FIV was isolated and all amplified *env* gene products were cloned directly into pGL8_{MYA}, a molecular clone of FIV-GL8. The nucleotide sequences of *env* of the three clones were determined. The nucleotide sequences derived from these clones were compared phylogenetically with the sequences from other FIV isolates and Brazilian sequences submitted to GeneBank.

FIV infected cats were identified using the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the *gag* gene (HOHDATSU et al., 1998) and using the SNAP FIV/FeLV Comb Test, IDEXX™ – Westbrook, EUA. One cat, Leviano, originated from an open shelter in Minas Gerais, Brasil (TEIXEIRA et al., 2007), and two other cats, Didi and Dengosa, originated from another open shelter in São Paulo, Brazil. All three cats were chronically infected. Virus were isolated by cultivation of the cats' PBMC (HOSIE et al., 2000). PBMCs were fractionated from 5 ml of whole blood by centrifugation over a Ficoll-Paque solution with density of 1.077 g/ml. The separated PBMCs were co-cultured with Mya-1 cells in the absence of mitogenic stimulation (MIYAZAWA et al., 1989). DNAs were prepared from positive viral isolations by column chromatography (QIAamp DNA maxiprep Kit; Qiagen). DNAs were prepared as soon as a positive ELISA for FIV p24 was recorded; thus, viruses had undergone minimal passage in vitro. Full-length viral envelope glycoprotein (*env*) genes were amplified form the replication-competent viruses by using a high-fidelity (proofreading) PCR

(High Fidelity PCR system; Roche) using primers corresponding to the 5' L-SU cleavage site (TAGACGCGTAAGATTAAAGGTATT) and *Nde*I site 3' of the Revresponsive element (CCCTTGAGGAAGATGTGTCATATGAATCCATT) incorporating *Mlu*I and *Nde*I restriction sites, respectively. Due to the inherent instability of the full-length *env* genes from primary isolates of FIV such as GL8, standard high-copy-number PCR product cloning vectors could not be used; thus, all amplified *env* gene products were digested with *Mlu*I/*Nde*I and were cloned directly into pGL8_{MYA}, a molecular clone of FIV-GL8 in the low-copy-number plasmid pBR328 and in which an *Mlu*I site had been introduced at the L-SU junction.

The nucleic acid sequence of seven independent *env* clones from each cat was determined using IRD800-labeled oligonucleotides on an automated sequencer, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebr. (HOSIE et al., 2002). DNA sequence alignments and analyses were conducted using BioEdit version 5.0.6 software (HALL, 1999). The first analysis included 2331 bp of the envelope glycoprotein sequences analyses, from the V2 region to the end of the *env* open reading frame (orf), 777 amino acids (Figure 1). The *env* gene V3-V5 regions encode neutralizing epitopes (LOMBARDI; BENDINELLI; GARZELLI, 1993; RIGBY et al., 1996), such that mutations in these regions induce resistance to viral neutralizing antibodies. Analyses have reported that a major neutralizing epitope is present in the V3 region (LOMBARDI; BENDINELLI; GARZELLI, 1993; RIGBY et al., 1996). In addition, V3-V5 region has been identified as having an important role in cell tropism, with mutations in V3 affecting potential sites for N-linked glycosylation which influence cell tropism (HOSIE et al., 2002) and therefore there are many V3-V5 sequences in GenBank including those from other FIV sequences reported previously from Brazil. In addition, a second analysis was conducted with 473 bp of sequence encoding a region of 157 amino acids comprising the V3-V4 region (Figure 2).

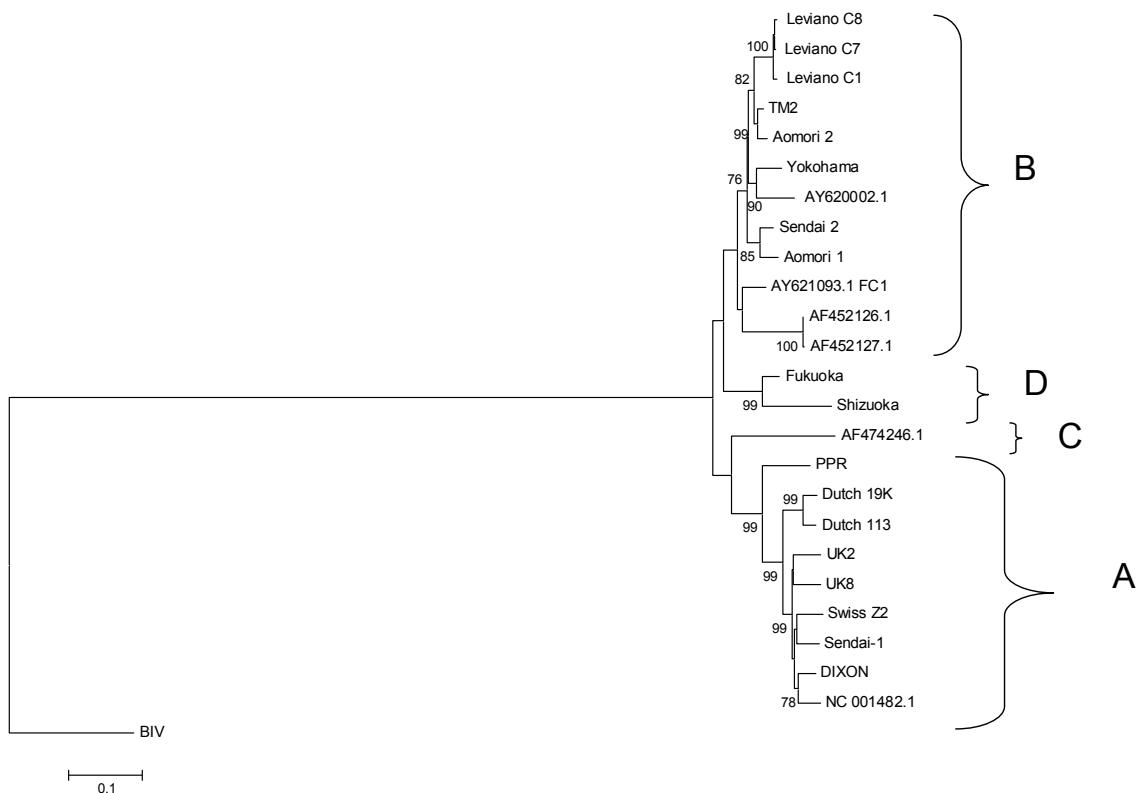


Figure 1 - Phylogenetic tree of 2295 pb sequences from the region of FIV *env*. The subtype of the obtained sequences was determined by phylogenetic analyses, using a rooted neighbour-joining tree with Kimura 2-parameter genetic distances and bootstrap analysis with 1000 iterations to evaluate clade consistency

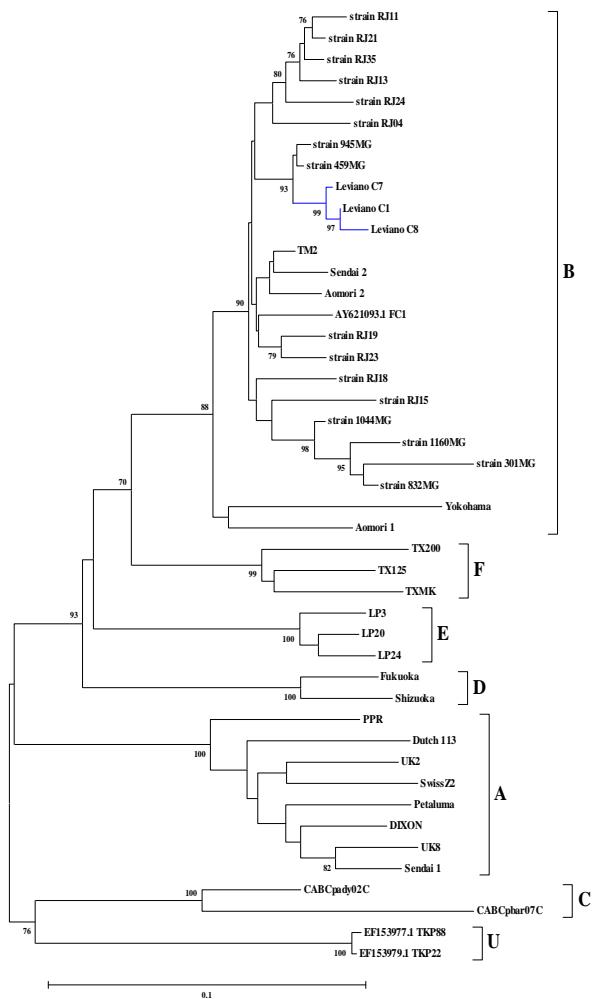


Figure 2 - Phylogenetic tree of 479 pb sequences from the V3-V4 region of FIV *env*. The subtype of the obtained sequences was determined by phylogenetic analyses, using a unrooted neighbour-joining tree with Kimura 2-parameter genetic distances and bootstrap analysis with 1000 iterations to evaluate clade consistency

Nucleotide sequence data from Leviano's clones reported in this paper have been deposited in the GenBank database under accession numbers FJ374695, Leviano C8, FJ374696, Leviano C1 and FJ374697, Leviano C7. Others FIV sequences included in the first phylogenetic tree are as follows (the GenBank accession numbers, names of isolates, country and subtype for the FIV *env* sequences are listed): X60725.1, Dutch 113, Netherlands, A; X57001.1, SwissZ2, Swiss, A; L00608.1, Dixon, United States, A; M73964.1, Dutch 19K1, Netherlands, A; M59418.1, TM2, Japan, B; M36968.1, PPR, United States, A; X69496.1, UK8, England, A; X69494, UK2, Scotland, A; D37813.1; Sendai 1, Japan, A; D37814.1, Sendai 2, Japan, B; D37815.1, Fukuoka, Japan, D; D37816.1, Aomori 1, Japan, B; D37811.1, Shizuoka, Japan, D; AF474246.1, Canada, C; NC_001482.1, refseq fiv, United States, A and M25381.1, Petaluma, United States, A.

For the second phylogenetic tree the GenBank accession numbers, names, country and subtype for the FIV *env* sequences included were: M25381.1, Petaluma, Unite Satates, A; L00608.1, Dixon, United States, A; M59418.1, TM2, Japan, B; M36968.1, PPR, Unite States, A; X69496.1, UK8, England, A; X69494, UK2, Scotland, A; X57001, SwissZ2, Switzerland, A; AY621093, FC1, United States (Florida), B; U02392.1, CABCPady02C, Canada, C; D84498, LP20, Argentine, E; D84496, LP3, Argentine, E; D84500, LP24, Argentine, E; D37813.1, Sendai 1, Japan, A; D37816, Aomori 1, Japan, B; D37814.1, Sendai 2, Japan, B; D37812, Yokohama, Japan, B; D37815.1, Fukuoka, Japan, D; D37817.1, Aomori 2, Japan, B; D37811.1, Shizuoka, Japan, D; AY139094.1, TX125, United States (Texas), F; AY139096.1, TX200, United States (Texas), F; AY139097.1, TXMK, United States (Texas), F; EF153977.1, TKP88, New Zealand, U; EF153979.1, TKP22, New Zealand, U; EU375619, RJ35, Brazil, B; EU375617, RJ24, Brazil, B; EU375616, RJ23, Brazil, B; B; EU375597.1, strain RJ04, Brazil, B; EU375604.1, strain RJ11, Brazil, B; EU375606.1, strain RJ13, Brazil, B; EU375608.1, strain RJ15, Brazil, B; DQ248885.1, strain 1044MG, Brazil, B; DQ177159.2, strain 945MG, Brazil, B; DQ641681.1, strain 459MG, Brazil, B; DQ865447.1, strain 301MG, Brazil, B; DQ865449.1, strain 832MG, Brazil, B; DQ865454.1, strain 1160MG, Brazil, B.

Analyses of the viral sequences present of molecular clones showed that all clones grouped within subtype B and that those clones varied from each other even the clones from the same cat. Neither the prevalence of FIV infection in Brazil nor all prevailing subtypes are known. Identification of circulating subtypes from different areas of Brazil is essential to develop strategies for molecular diagnosis, since the genetic diversity is high (KANN et al., 2007). A recent publication declared that Brazilian FIV strains and their epidemic spread have

not been deeply characterized (MARTINS et al., 2008). In this study the analyses classified the clones as subtype B in accordance with other reports from Minas Gerais and also the Brazilian state of Rio de Janeiro (CAXITO et al., 2006; MARTINS et al., 2008). The isolation and characterization of FIV *env* genes from Minas Gerais and São Paulo states is the first of its kind. It is important to state that Minas Gerais, São Paulo and Rio de Janeiro are neighbouring states and Brazil is a huge country. To verify the difference between the clones from Brazilian isolates, HIV pseudotype assays were performed using the methods described previously (WILLETT et al., 2006). In addition, the viral variants were compared for receptor usage. All clones were infected MCC cells expressing the native feline CD134 (FFF) and the FFHH chimaeric version of CD134 but the luciferase activity from all clones showed different values (data not shown).

We observed variability amongst the clones isolated from three infected cats and, in agreement with a recent study, our results confirmed that biological isolates contain heterogeneous viral quasispecies (HUISMAN et al., 2008). These results are consistent with the emergence of a quasispecies and the diversity of the viruses examined confirmed previous observations (KYAW-TANNER; ROBINSON, 1996). Quasispecies arise as the virus-encoded reverse transcriptase (RT) enzyme, an RNA-dependent DNA polymerase that is present in mature virions of all members of the *Retroviridae*, lacks a proofreading mechanism that corrects for erroneously incorporated nucleotides, resulting in extensive sequence variation, a typical feature of lentiviruses that includes base substitution, addition, and deletion (ROBERTS; BEBENEK; KUNKEL, 1988). Previously, intrahost sequence variation has been assessed based on sequence analyses of PCR amplicons obtained using DNA isolated from the PBMC of infected cats as a template, reflecting the most abundant proviral genomes rather than the complete repertoire of virus sequences in circulation (HUISMAN et al., 2008). In this study, FIV *env* was analyzed since this gene encodes the protein that is a target for the humoral response and is known for its capacity to escape from recognition by antibodies by the accumulation of mutations in the variable regions especially. Sequence variation was most extensive in the V3-V6 region, where none of the analyzed sequences were identical.

Knowing the prevalence and variability of FIV is of importance for designing and testing vaccines under field conditions. The sequence of the *env* gene is particularly important since the envelope glycoprotein is the major target for virus neutralization (LOMBARDI; BENDINELLI; GARZELLI, 1993; RIGBY et al., 1996) and it may be possible to establish

potential associations between specific subtypes and the severity of clinical outcomes (REGGETI; BIENZLE, 2004).

In the study we observed that FIV displays genetic variation amongst the variants identified within three biological isolates (Figures 1 and 2). Further studies will be required to identify the importance of the variability amongst Brazilian FIV isolates identified in this study. Preliminary data have shown variable cell tropism amongst the clones in their ability to infect MCC cell expressing CD134. Since the *in vivo* cell tropism of FIV expands as disease progresses (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996) and a single potential site for N-linked glycosylation in the envelope glycoprotein of FIV modulates the virus-receptor interaction (WILLETT et al., 2008), even minor variation in the *env* gene could have great significance. Sequence variations and conformational changes within *env* protein are responsible for determining the receptor usage of FIV (LERNER; ELDER, 2000). Chemokine receptor tropism has been linked to specific sequence variations in the *env* of primate lentiviruses (CHO et al., 1998). For FIV, a mutation in V3 is sufficient to convert a non-CRFK tropic virus into a CRFK-tropic virus (VERSCHOOR et al., 1995). Other domains of SU distinct from V3 have also been identified as important determinants and/or co-determinants of cell tropism in HIV-1 (PALMER et al., 1996). The results of this work would provide further information for studies involving structure, diagnosis, vaccine development and phylogenetic analysis of FIV.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ayman Samman for excellent assistance in the evolutionary tree analyses.

This work was supported from grants 07 04180-2 of the FAPESP (the São Paulo State research funding foundation), 480330-2007-7 of the CNPq (Brazil's National Research Council) and Public Health Service grant AI049765 to B.J.W and M.J.H from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

REFERENCES

- CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. S.; SILVA, E. F. A.; RAVAZZOLO, A. Detection of feline immunodeficiency provirus in domestic cats by polymerase chain reaction. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 20-25, 2000.
- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 953-956, Nov, 2006.
- CHO, M. W.; LEE, M. K.; CARNEY, M. C.; BERSON, J. F.; DOMS, R. W.; MARTIN, M. A. Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. **Journal of Virology**, v. 72, n. 3, p. 2509-2515, Mar, 1998.
- DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5169, Aug, 1996.
- DUARTE, A.; TAVARES, L. Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency Virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 1-2, p. 25-33, Apr, 2006.
- ELDER, J. H.; DEAN, G. A.; HOOVER, E. A.; HOXIE, J. A.; MALIM, M. H.; MATHES, L.; NEIL, J. C.; NORTH, T. W.; SPARGER, E.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A.; YAMAMOTO, J.; YUHKI, N.; PEDERSEN, N. C.; MILLER, R. H. Lessons from the cat: feline immunodeficiency virus as a tool to develop intervention strategies against human immunodeficiency virus type 1. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 14, n. 9, p. 797-801, Jun, 1998.
- ENGLISH, R. V.; JOHNSON, C. M.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. B. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5175-5186, Sep, 1993.
- GOODENOW, M.; HUET, T.; SAURIN, W.; KWOK, S.; SNINSKY, J.; WAIN-HOBSON, S. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 2, n. 4, p. 344-352, 1989.
- GREENE, W. K.; MEERS, J.; DEL FIERRO, G.; CARNEGIE, P. R.; ROBINSON, W. F. Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus env genes in isolates from naturally infected cats. **Archives of Virology**, v. 133, n. 1-2, p. 51-62, 1993.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal Virology**, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, Mar, 2007.

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, Jan, 1998.

HOSIE, M. J.; DUNSFORD, T.; KLEIN, D.; WILLETT, B. J.; CANNON, C.; OSBORNE, R.; MACDONALD, J.; SPIBEY, N.; MACKAY, N.; JARRETT, O.; NEIL, J. C. Vaccination with inactivated virus but not viral DNA reduces virus load following challenge with a heterologous and virulent isolate of feline immunodeficiency virus. **Journal Virology**, v. 74, n. 20, p. 9403-9411, Oct, 2000.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 11, p. 293-297, Sep, 1989.

HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J.; KLEIN, D.; DUNSFORD, T. H.; CANNON, C.; SHIMOJIMA, M.; NEIL, J. C.; JARRETT, O. Evolution of replication efficiency following infection with a molecularly cloned feline immunodeficiency virus of low virulence. **Journal Virology**, v. 76, n. 12, p. 6062-6072, Jun, 2002.

HUISMAN, W.; SCHRAUWEN, E. J.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. Intrahost evolution of envelope glycoprotein and OrfA sequences after experimental infection of cats with a molecular clone and a biological isolate of feline immunodeficiency virus. **Virus Research**, v. 137, n. 1, p. 24-32, Oct, 2008.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3639-3646, Jun, 1995.

KANN, R.; SEDDON, J.; KYAW-TANNER, M.; MEERS, J. Co-infection with different subtypes of feline immunodeficiency virus can complicate subtype assignment by phylogenetic analysis. **Archives of Virology**, v. 152, n. 6, p. 1187-1193, 2007.

KYAW-TANNER, M. T.; ROBINSON, W. F. Quasispecies and naturally occurring superinfection in feline immunodeficiency virus infection. **Archives Virology** v. 141, n. 9, p. 1703-1713, 1996.

LARA, V. M.; TANIWAKIII, S. A.; ARAÚJO JR, J. P. Phylogenetic characterization of feline immunodeficiency virus (FIV) isolates from the state of São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 467-470, 2007.

LERNER, D. L.; ELDER, J. H. Expanded host cell tropism and cytopathic properties of feline immunodeficiency virus strain PPR subsequent to passage through interleukin-2-independent T cells. **Journal Virology**, v. 74, n. 4, p. 1854-1863, Feb, 2000.

LOMBARDI, S.; BENDINELLI, M.; GARZELLI, C. Detection of B epitopes on the p24 gag protein of feline immunodeficiency virus by monoclonal antibodies. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 2, p. 141-146, Feb, 1993.

MARTINS, A. N.; MEDEIROS, S. O.; SIMONETTI, J. P.; SCHATZMAYR, H. G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R. M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naive cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7863-7874, Aug, 2008.

MIYAZAWA, T.; FURUYA, T.; ITAGAKI, S.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 108, n. 1-2, p. 131-135, 1989.

OLMSTED, R. A.; HIRSCH, V. M.; PURCELL, R. H.; JOHNSON, P. R. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 20, p. 8088-8092, Oct, 1989.

PALMER, C.; BALFE, P.; FOX, D.; MAY, J. C.; FREDERIKSSON, R.; FENYO, E. M.; MCKEATING, J. A. Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. **Virology**, v. 220, n. 2, p. 436-449, Jun, 1996.

PANCINO, G.; FOSSATI, I.; CHAPPEY, C.; CASTELOT, S.; HURTREL, B.; MORAILLON, A.; KLATZMANN, D.; SONIGO, P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, v. 192, n. 2, p. 659-662, Feb, 1993.

PECORARO, M. R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 77, Pt. 9, p. 2031-2035, Sep, 1996.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 4790, p. 790-793, Feb, 1987.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 34, p. 152-155, 1997.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. **The Journal of General Virology**, v. 85, Pt. 7, p. 1843-1852, Jul, 2004.

RIGBY, M. A.; MACKAY, N.; REID, G.; OSBORNE, R.; NEIL, J. C.; JARRETT, O. Immunogenicity of a peptide from a major neutralising determinant of the feline immunodeficiency virus surface glycoprotein. **Vaccine**, v. 14, n. 12, p. 1095-1102, 1996.

ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1171-1173, Nov, 1988.

RYAN, G.; GRIMES, T.; BRANKIN, B.; MABRUK, M. J.; HOSIE, M. J.; JARRETT, O.; CALLANAN, J. J. Neuropathology associated with feline immunodeficiency virus infection highlights prominent lymphocyte trafficking through both the blood-brain and blood-choroid plexus barriers. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 4, p. 337-345, Aug, 2005.

SIEBELINK, K. H.; CHU, I. H.; RIMMELZWAAN, G. F.; WEIJER, K.; OSTERHAUS, A. D.; BOSCH, M. L. Isolation and partial characterization of infectious molecular clones of feline immunodeficiency virus obtained directly from bone marrow DNA of a naturally infected cat. **Journal of Virology**, v. 66, n. 2, p. 1091-1097, Feb, 1992.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994a.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994b.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Epidemiological study of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic cats in the city of Rio de Janeiro **Clínica Veterinária**, v. 36, p. 14-21, 2002.

TALBOTT, R. L.; SPARGER, E. E.; LOVELACE, K. M.; FITCH, W. M.; PEDERSEN, N. C.; LUCIW, P. A.; ELDER, J. H. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 15, p. 5743-5747, Aug, 1989.

TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, Aug, 2007.

TORTEN, M.; FRANCHINI, M.; BARLOUGH, J. E.; GEORGE, J. W.; MOZES, E.; LUTZ, H.; PEDERSEN, N. C. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 65, n. 5, p. 2225-2230, May, 1991.

VERSCHOOR, E. J.; BOVEN, L. A.; BLAAK, H.; VAN VLIET, A. L.; HORZINEK, M. C.; DE RONDE, A. A single mutation within the V3 envelope neutralization domain of feline immunodeficiency virus determines its tropism for CRFK cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4752-4757, Aug, 1995.

WEAVER, E. A.; COLLISON, E. W.; SLATER, M.; ZHU, G. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, Feb, 2004.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; LOGAN, N.; SAMMAN, A.; HOSIE, M. J. A single site for N-linked glycosylation in the envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus modulates the virus-receptor interaction. **Retrovirology**, v. 5, p. 77, 2008.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; RIDHA, S.; HOSIE, M. J. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3386-3394, Apr, 2006.

YAMAMOTO, J. K.; PU, R.; SATO, E.; HOHDATSU, T. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. **Aids**, v. 21, n. 5, p. 547-563, Mar, 2007.

CAPÍTULO V

SLOWER INTRAHOST EVOLUTION OF V4-V6 ENVELOPE GENE AND PARAMETERS OF DISEASE PROGRESSION IN BRAZILIAN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic cats is associated with early robust humoral and cellular anti-viral immune response followed by a progressive immune suppression that results eventually in AIDS. FIV has extensive sequence variation within the *env* gene encoding the envelope glycoprotein (Env), a feature that is typical of lentiviruses. Two viral mechanisms contribute to the generation of variability of FIV within an individual, the introduction of mutations into the viral genome by the error-prone reverse transcriptase, and recombination between pre-existing viral populations. Little is known about Brazilian FIV strains and disease progression. The aim of this study was to determine whether disease progression is influenced by a viral evolution, to examine sequence divergence of viral variants and to determine laboratory parameters characteristic of disease progression which allow a better description of the chronic phase of the infection. Analysis of the V4 to V6 domains of the FIV *env* gene was carried out four times over a period of 15 months in a group of naturally infected cats. In each sample, blood samples were analyzed for the following: complete hematology, clinical chemistry and serum protein electrophoresis. Unexpectedly, little sequence variation was observed amongst viruses circulating in samples collected at various time points from each infected cat. Changes were observed in the following hematological and clinical chemistry parameters in the FIV-infected cats between the first blood sampling and last blood sampling: packed cell volume (PCV), hemoglobin, total white blood cells (WBC), total protein and gamma globulin fractions. A longer follow up time may have reveal greater intra-host viral variation as a result of selective immune-pressure. Monitoring of hematological and clinical chemistry parameters may prove useful for the evaluation of disease progress.

Keywords: FIV. Sequence variability. Disease progression.

1 INTRODUCTION

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a member of the Lentivirus genus of the Retroviridae family (PEDERSEN et al., 1987). FIV is an important viral pathogen that infects the domestic cat and which causes a slow progressive degeneration of the immune system which eventually leads to a disease comparable to acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in humans. The major characteristic of FIV infection is the CD4+ T-cell loss and reduced CD4+/CD8+ ratios which precedes the development of immunodeficiency in a proportion of infected cats. When compared with HIV-1 infection, FIV infection has a longer asymptomatic stage, a higher cell-proviral load, a slower CD4+ T-cell decline, a lower frequency of vertical transmission and a lower mortality (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 2007). The outcome of infection depends on the balance between the viral destruction of the immune system and the ability of the remaining immune system to eliminate the virus.

The virus persists in the cat host through active replication and is able to avoid clearance by the immune system. Active replication is an important component of the rapid evolutionary potential of FIV, a potential which manifests itself in the evolution of immune escape variants, drug resistant variants, and variants with the ability to use cell surface receptors in a different way (ELDER et al., 2008; MARTINS et al., 2008; WILLETT et al., 2010). As independent FIV isolates were identified and characterized, it became evident that genomic heterogeneity existed among different isolates. Sequence analysis confirmed these results and showed that diversity was not evenly distributed throughout the genome, but was greatest in the envelope gene, *env* (OLMSTED et al., 1989; PANCINO et al., 1993; SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995). Lentiviruses are complex retroviruses containing accessory genes which encode regulatory proteins, in addition to three large open reading frames (ORFs), *gag*, *pol* and *env*. FIV does not contain the *vpr*, *vpu* or *nef* “accessory” genes that are present in HIV (ELDER et al., 2008). The *env* gene encodes the viral glycoprotein (gp120) and the transmembrane protein (gp41). Isolates can be grouped into at least five distinct subtypes or clades, according to variations in the *env* gene sequence (15% to 30%) which also influence their pathogenicity. These are designated A to E and recombinant strains (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996), a number that can be expected to increase as further studies reveal additional diversity (WEAVER et al., 2004; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). Within a subtype, there can exist sub-

subtypes, which are distinct lineages that are very closely related to one subtype (LARA; TANIWAKIII; ARAÚJO JR, 2007).

Retroviruses have relatively rapid rates of recombination due to the presence of a diploid genome and the occurrence of multiple infections (HU; TEMIN, 1990). Several of these cases involve two strains of the same subtype (KYAW-TANNER; ROBINSON, 1996). Recombinant viruses have been found involving every group and nearly every subtype of viruses from *Retroviridae* family (MCGRATH et al., 2001). Retrovirus replication involves the use of three separate polymerase systems, each with its own distinct potential for introducing errors. In the integrated (proviral) state of viral DNA, the cellular DNA replication machinery carries out replication of the viral genetic information presumably with high fidelity. Synthesis of viral genomic RNA by the host RNA polymerase II is a potentially error-prone step, although at present the contribution of this step in introducing mutations is poorly understood. More often, error-prone DNA synthesis by the viral DNA polymerase, RT, is envisioned as the ultimate source of viral sequence diversity. A major contribution to the propensity of RT to incorporate point mutations is the absence of an exonuclease activity that would permit proof-reading of misincorporated bases, although potential rudimentary proofreading mechanisms involving pyrophosphorolysis or dinucleotide polyphosphate synthesis have been uncovered (ARION et al., 1998; MEYER et al., 1998).

The first step during infection of the target cell is the attachment of the virion to the cell surface and the specificity of this interaction determines both the cell tropism and the pathogenicity of the virus (WILLETT et al., 2006). The virus enters host cells via a sequential interaction, initiated by the envelope glycoprotein binding the primary receptor molecule CD134 and followed by a subsequent interaction with the chemokine co-receptor CXCR4 (SHIMOJIMA et al., 2004). In addition, a number of FIV strains can infect CXCR4-positive cells that do not express CD134 (DE PARSEVAL et al., 2004). Replication in such cell types is thought to contribute to different manifestations of the disease (HARTMANN, 1998). Progression of the disease follows a pattern typical of that observed with primate lentiviruses, starting with a relatively short acute phase characterized by increasing viral loads. Mild to moderate clinical signs, usually limited to vague malaise, fever and anorexia, have been reported during the primary stage of replication (CALLANAN et al., 1992; BENDINELLI et al., 1995). Infected cats may develop a generalized lymphadenomegaly that may persist for weeks or months. This primary stage disease is rarely identified in the field. A decrease in plasma viral load marks the beginning of the asymptomatic phase denoted by relatively strong antiviral immune responses. A prolonged asymptomatic period follows, sometimes lasting

years or even the life-time of the cat, which is associated with a gradual decline in CD4+ T-cell numbers; a reduction in the CD4+/CD8+ ratio and minimal clinical signs. The terminal phase is marked by immunologic decompensation, generalized lymphoid depletion; and in some cats, hyperglobulinemia, which results from B-cell hyperactivation (BENDINELLI et al., 1995; HOSIE; BEATTY, 2007). As a result, the electrophoretogram, CD4+/CD8+ ratio and plasma viral load have been proposed as a prognostic tool in cat with FIV infection (MIRO et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2007; HOSIE et al., 2009). In FIV infection, when clinical symptoms are observed, these are by no means pathognomonic. In addition, no pattern from the analyses routinely performed may be clearly linked to this disease (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997). This is a big handicap in determining the present clinical state of the animal and predicting disease progression. Peripheral blood cytopenias such as anemia, leucopenia with neutropenia and thrombocytopenia may be observed frequently in cats infected with FIV (LINENBERGER et al., 1995). Although previous studies report that cytopenia has been observed in FIV-infected symptomatic cats, the asymptomatic cats also present with cytopenia occasionally (FUJINO et al., 2009).

The present study was designed to determine whether the follow-up samples of hematological parameters in infected cats and variability viral in FIV burdens can be useful complementary tests to evaluate the progress of FIV infection. Furthermore, it was anticipated that this study would help to better characterize Brazilian FIV infection and the initial clinical status of FIV infected cats, and the clinical course of this chronic disease.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Study animals and sample collection

Epidemiological investigations show that FIV transmission is influenced by behavior. Cats that are free-roaming in areas of high cat density have an increased opportunity for exposure largely because bite wounds are known to be the most important mode of transmission (HOSIE; ROBERTSON; JARRETT, 1989). In view of this, blood samples were collected specifically for this study from 55 adult domestic short-haired cats (which represented both sexes), from an open shelter in São Paulo, Brazil. Many of these cats had been found on the street. This shelter has reported FIV infection. All cats from this shelter were sampled on August 26th, 2007 (T₀). All 13 cats that were infected with FIV until the end of study were sampled also at six (T₁), ten (T₂) and fifteen (T₃) months after the basal sampling (T₀). Blood samples obtained by jugular venipuncture were collected in serum separator and EDTA treated glass tubes and three blood smears were performed on site. Serum and whole blood were also always stored at -80°C until testing was completed.

Biochemical parameters may be influenced by feeding and the time of blood collection. To minimize such factors, the animals were made to fast for 12 h before blood sampling in the early morning.

Animal handling, treatment, reagent manipulations and data collection were all carried out in compliance with the guidelines of Good Clinical Practice, and Good Laboratory Practice of the Animal Welfare Committee of the Veterinary Clinical Hospital and University of São Paulo.

2.2 Detection of retroviral infection

FIV infected cats were identified using the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the gag gene (HOHDATSU et al., 1998) and using the SNAP FIV/FeLV Comb Test, IDEXX™ – Westbrook, EUA. All cats were also tested for the presence of feline leukemia virus (FeLV) gag-related antigens in serum by ELISA, SNAP FIV/FeLV Comb Test,

IDEXX™ – Westbrook, EUA, and in circulating granulocytes and platelets on blood smears by indirect immunofluorescence (VMRD, Inc. Pulman, Washington, USA).

2.3 *env* PCR

The polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the *env* sequence encompassing a variable region of the FIV gene, 862 bp, present in nine naturally infected cats. Proviral FIV DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained in four samples of each positive cats. The resulting product spanned sequences encoding V4, V5 and V6 domains of FIV envelope, located at positions 7320-8182. Purified double-stranded genomic DNA was added to 25 µl of total reaction mix. The reaction mix contained a final concentration of 10 pmole of each primer, 200 µM of each dNTP, Taq polymerase (Platinum®, Invitrogen, Brazil) and reaction buffer. Primers used were 5'-CAAAATGTGGRTGGTGGAAAY-3' and 5'-ACCATYCCWATDGCDGTRGC-3'. After denaturation at 94°C for 5 min., 30 cycles were performed of denaturation, annealing at 58°C and extension for 1 min at 72°C. After the last cycle reactions were continued for 10 min at 72°C.

2.4 PCR product purification and DNA sequencing

PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit, Qiagen. DNA was eluted in nuclease-free water and either used immediately or stored at -20°C. The FIV *env* genes were sequenced using the Genetic Analyzer AB3130X (Applied Biosystems) using the Big Dye Terminator V1.1 Kit (Applied Biosystems). The reaction mixture consisted of 100 ng/µL purified DNA, 3.2 pmol of each of the primers, 4µL sequencing buffer and 2 µL sequencing enzyme in 20 µL reactions. Cycling conditions were as per the manufacturer's protocol. Raw chromatographic data were analyzed using 'Contig Express' sequence analysis software within the Vector NTI suite of programs (InVitrogen). Chromatogram traces which appeared to contain multiple peaks were discarded.

2.5 Phylogenetic analysis and evolutionary rates

Nucleotide sequence analysis was performed by ClustalX (LARKIN et al., 2007) and BioEdit (version 7.0.9.0) applications, followed by manual adjustment to maximize similarities. Alignments were translated and the resulting amino acid-based alignments were used as an exact guide for re-positioning of improper gapping, particularly where sequences differed in length. Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method on the segment of env region, V4 to V6. Robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis on 1000 replicates to assess the support at each of the internal nodes of the Neighbour-joining tree. The phylogenetic tree was committed for final editing and graphical representation using MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

The evolutionary rate for Brazilian FIV from the V4-V6 env region was calculated from the sequence from each of the fourth serial samples taken one year apart from nine naturally infected cats.

2.6 Hemogram and biochemical parameters

A complete blood count of the EDTA tubes was performed using an automated haematology analyzer (ABC Vet Hematology Analyzer, ABX Horiba, Japan). Differential white blood cells (WBC) counts were performed in blood smears using a May-Grunwald-Giemsa modified stain. Platelet numbers were estimated by smear and formally counted. Urea, creatinin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate amminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), total protein (TP), albumin, were performed on serum samples using an automated chemistry analyzer, LABMAX 240, Tokyo Boeki machinery, Tokyo, Japan.

2.7 Eletrophoretic separation of plasma proteins

Cellulose acetate strips were immersed in veronal buffer (diethyl barbituric acid, 3.12 g/l; sodium diethylbarbiturate, 17.1 g/l; pH 8.6) and blotted lightly between sheets of filter paper to remove excess buffer. Plasma samples were applied on the strips with a twin wire applicator. The strips were then placed in the electrophoresis tank (BioSystems, Atom, Barcelona Spain) and a constant voltage of 200 V and a current of 3.5 mA/strip were applied for 35 min. The strips were stained with amino black for 10 min. The excess stain was removed by washing the strips in a solution of acetic acid and methanol (47.5% methanol, 5% acetic acid). The strips were then scanned on a Helena Optiscan (Helena Laboratories, TX, USA) densitometer.

2.8 Statistical analysis

Data obtained from the different samples, (T_0), (T_1), (T_2) and (T_3), were displayed or calculated by the box plot method. In all figures displaying box plots, the box extends from the 25th percentile to the 75th percentile, with a horizontal line at the median, and the whiskers extend down to the smallest value and up to the largest value. Hematological and biochemical parameters for repeated measurements were analyzed and compared by the Wilcoxon rank sum test, significant differences ($P < 0.05$).

3 RESULTS

Of the 55 cats, 23 were naturally infected by FIV (41.2%), seven by FeLV (12.7%) five by both viruses (9.1%) and 20 were non-infected (36.4%). The serological and PCR results agreed in all cases: there were no discordant results. All FIV positive cats in the study were in the asymptomatic phase with non-specific clinical signs. Hence it follows that all cats were chronically infected, demonstrating frequently enlarged peripheral lymph nodes and inflammation in the oral cavity ranging from a slight to mild stomatitis or periodontitis sometimes with a hyperplastic appearance. CNS signs were not found.

All Brazilian samples of FIV, in this study, clustered together within FIV subgroup B (data not shown). Unexpectedly, little sequence variation was observed in circulating viruses from each infected cat between each collection (see Table 1 and Figure 1).

No correlations were observed between sequence variability and clinical signs or hematological parameters in the FIV positive cats.

When the hematological parameters of T₀, T₁, T₂ and T₃ of FIV-positive cats were analyzed by the Wilcoxon rank sum test, only a few significant but important differences were found, including decrease in packed cell volume (PCV; $P = 0.014$), hemoglobin ($P = 0.046$) and total white blood cells (WBC; $P = 0.046$) between T₀ and T₃ (Figure 2, 3 and 4).

Table 1 - Summary of divergence from segment of env region, V4 to V6, of the FIV per cat

Cat	% Divergence
Nalva	0.008
Juquihna	0.004
Real	0.01
Dengosa	0.006
Monalisa	0.013
Sara	0.002
Didi	0.01
Dalila	0
Paixao	0.026
Mean	0.00877778
Mean per year*	0.007

*Divergence per year was calculated as:
(divergence x 52)/weeks examined.

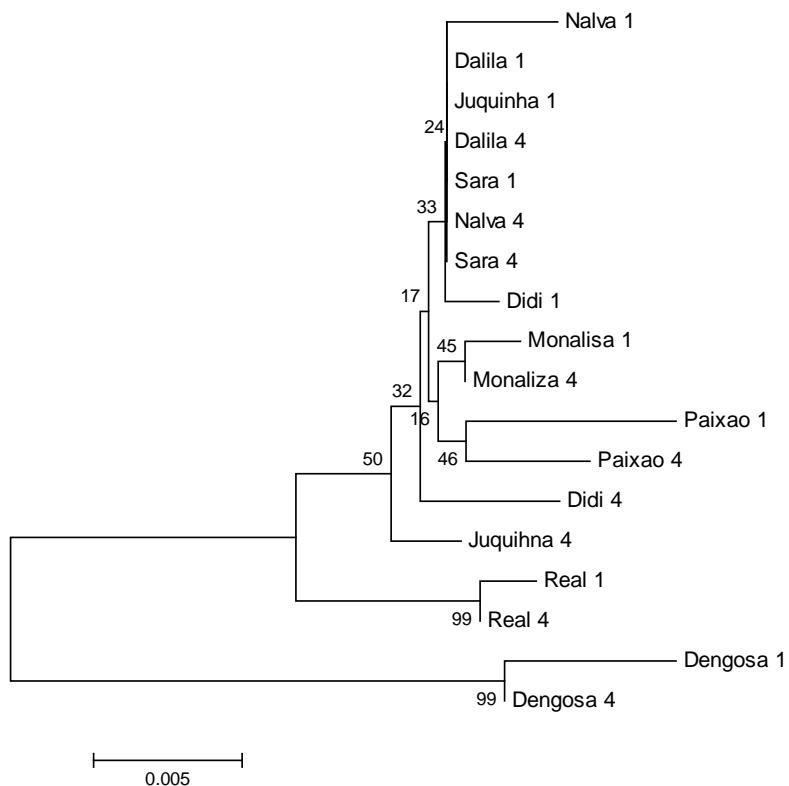


Figure 1 - Neighbour joining phylogenetic tree of env V4-V6 sequences, 563 bp, of FIV collected T₀ (first sample) and T₃ (fourth sample) of each cat. Numbers shown are bootstrap values, based on 1000 iterations

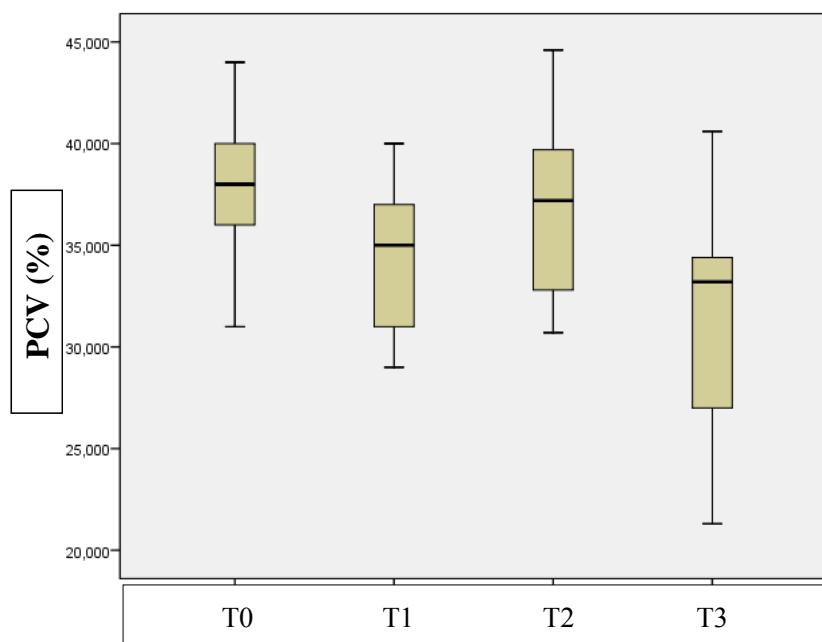


Figure 2 - Box plot of PCV from FIV-positive cats T₀, T₁, T₂ and T₃. *, P < 0,05 (Wilcoxon rank sum test)

t)

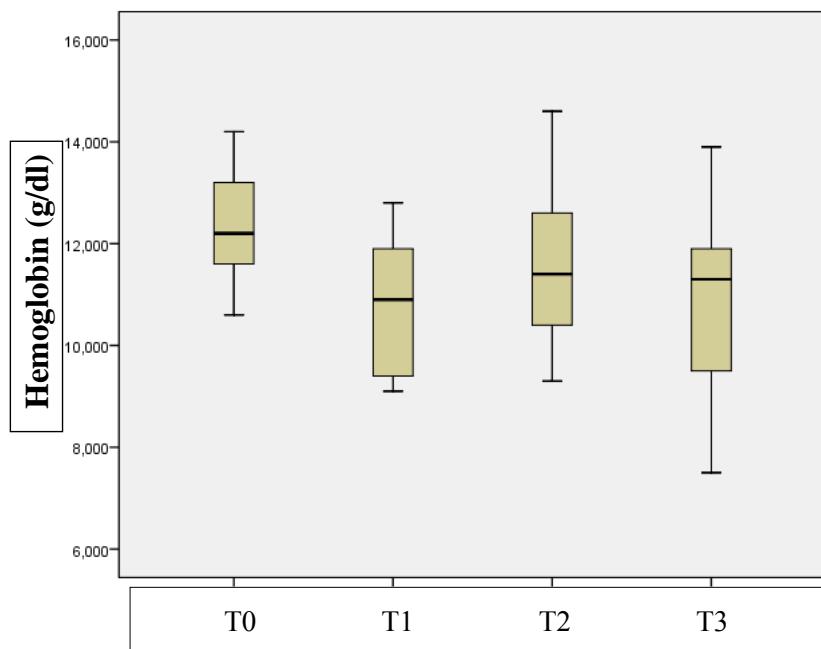


Figure 3 - Box plot of hemoglobin concentration of the FIV-positive cats T_0 , T_1 , T_2 and T_3 . *, $P < 0,05$ (Wilcoxon rank sum test)

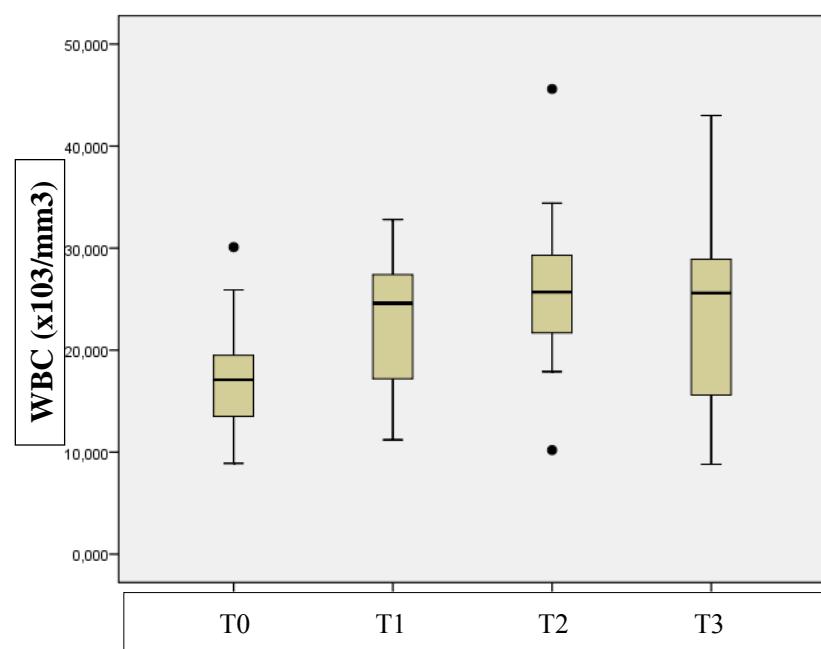


Figure 4 - Box plot of WBC of the FIV-positive cats T_0 , T_1 , T_2 and T_3 . *, $P < 0,05$ (Wilcoxon rank sum test)

Significant differences in biochemical parameters of the FIV- positive cats were seen between the first blood sampling and the fourth blood sampling in the mean values of total serum protein ($P = 0.013$; Figure 5) and in the concentration of gammaglobulins ($P = 0.01$; Figure 6), an unspecific polyclonal hypergammaglobulinemia. The differences in the gammaglobulins could be seen as in its concentration as eletrophoretogram (Figure 6).

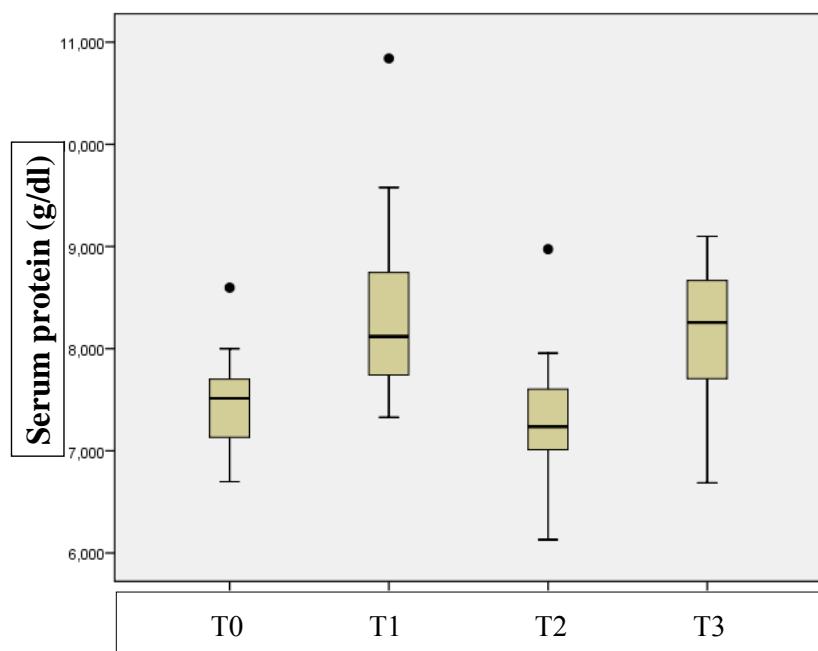


Figure 5 - Box plot of serum protein of the FIV-positive cats T_0 , T_1 , T_2 and T_3 . *, $P < 0,05$ (Wilcoxon rank sum test)

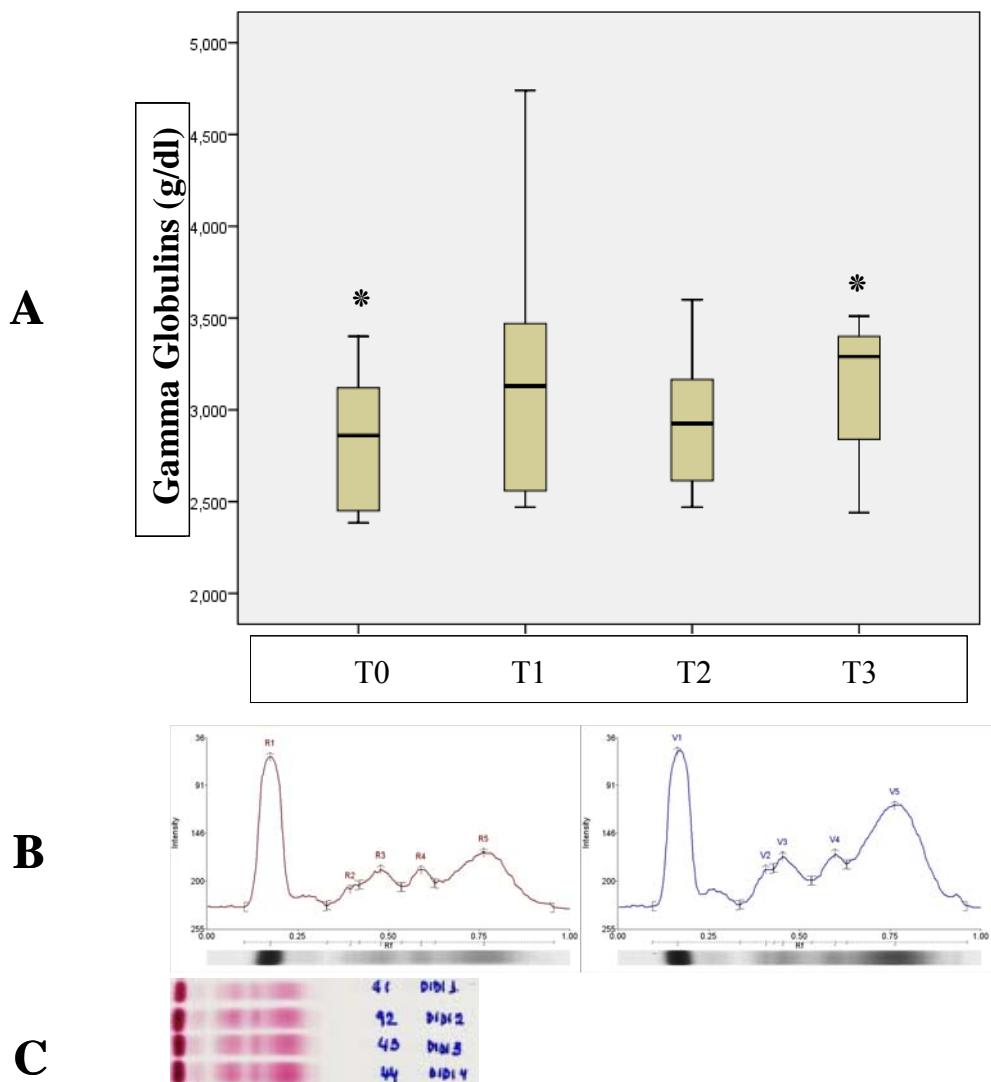


Figure 6 - (A) Box plot of gamma globulin of the FIV-positive cats T₀, T₁, T₂ and T₃. *, P < 0,05 (Wilcoxon rank sum test). (B) Electropherogram T₀ and T₃: albumin; α1 – globulins; α2 – globulins; β – globulins and Gamma globulins of a FIV-positive cat, Didi. (C) The cellulose acetate strip of Didi in the T₀, T₁, T₂ and T₃

4 DISCUSSION

Attempts have been made to define the clinical course of FIV infection in different stages analogous to those of HIV infection in man. In cats, three or four clinical phases have been identified (HARTMANN, 1998; HOSIE; BEATTY, 2007) because the two different stages of persistent generalized lymphadenopathy, also termed lymphadenopathy syndrome, and the AIDS-related complex in humans are rarely distinguished in cats. As the study presented here was performed with conventional animals under field conditions, it was difficult to stage the infections, but all FIV positive cats in the study were chronically infected.

FIV infection in Brazil has not been well evaluated. Prevalence rates and regional variations are largely unexplored (MARTINS et al., 2008). In the present study, we determined the estimates of evolutionary rates from sequences of a V4-V6 segment of *env* region for FIV provirus derived from PBMC obtained from cats which had been naturally infected. This region of the FIV genome was chosen because of its variability (TEIXEIRA et al., 2010), and since the Env protein is a target for the humoral immune responses and is known for its capacity to escape from recognition by antibodies by accumulating mutations in the variable regions (KRAASE et al., 2010). Sequence evolution reflects the capacity of lentiviruses to adapt in response to the restrictions imposed by the environment, the host and its immune responses. During this study little sequence variation was observed in viruses circulating in infected cats at different times (Table 1 and Figure 1). However as little sequence variation was observed, our results emphasise that the FIV genome exhibits sequence variation both between cats and within individual animals at any point in time. At any given time, the virus population of a FIV infected animal could be dynamic and heterogeneic.

FIV in general seems to replicate more slowly than HIV-1 (YAMAMOTO et al., 2007). Although for HIV-1 and FIV, peak viral loads during acute infection vary greatly (from approximately 10^3 to 10^6) the peak of HIV-1 replication is reached within 2 to 3 weeks after infection (SCHACKER et al., 1998; STERLING et al., 2001) while that of FIV is reached between 2 and 3 months post infection (HOSIE et al., 2009). Therefore, it could be speculated that the slower replication kinetics of FIV contribute to a lower mutation rate and a higher genetic stability over time. A longer follow up time may have exposed a higher degree of intra-host variation as a result of selective immune-pressure. However, without molecular

cloning, the existence of minor quasispecies would not have been detected (KYAW-TANNER; ROBINSON, 1996). Like HIV, there are two viral mechanisms that contribute to the generation of variability of FIV within a cat. One is the introduction of mutations into the viral genome by the error-prone reverse transcriptase (RT), and the other is the recombination between pre-existing viral populations (PRESTON; DOUGHERTY, 1996; HAYWARD; RODRIGO, 2008). However, intra-subtype recombination is difficult to document often because of the similarity of the parental strains involved (HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007).

Studies have reported evolutionary rates for FIV range from 3.1×10^{-3} to 6.6×10^{-3} substitutions per site per year from the *env* region (GREENE et al., 1993; HAYWARD; RODRIGO, 2010). Our FIV evolutionary rate estimates were lower compared to other studies. Studies of HIV-1 evolution have shown variable rates of replacement of viral variants (MEYERHANS et al., 1989; SIMMONDS et al., 1991). The small variability of FIV in this study could be also explained because the clade B viruses, including Brazilian FIV (CAXITO et al., 2006; LARA; TANIWAKIII; ARAÚJO JR, 2007; TEIXEIRA et al., 2010), may be more ancient and relatively host adapted and thus may be less virulent (BACHMANN et al., 1997; PISTELLO et al., 1997). Generally, pathogens adapt to coexist with the host, without causing the death of the host or severe illness, maximizing the pathogen's transmission efficiency. Complex quasispecies were detected in asymptomatic humans infected with HIV-1, whereas limited viral heterogeneity was detected in very rapid progressors (KUSUMI et al., 1992; GANESHAN et al., 1997). Similarly, a high level of genetic diversity in simian immunodeficiency virus-infected macaques did not appear to correlate with disease progression (JOHNSON; HIRSCH, 1992). The selective forces driving such evolution may include strong and changing immune responses (MCGRATH et al., 2001; KRAASE et al., 2009), as well as viral adaptation to growth in different cell types (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996). A study investigating the use of CD134 as a functional receptor by sequential isolates would shed light on the pathogenesis of infection.

In Brazilian cats, FIV infected cats have been observed over a prolonged asymptomatic period (HAGIWARA; RECHE Jr., preliminary observation). During these long periods, few clinical signs by definition were observed, although the virus was replicating and inducing changes in the immune system, leading to a progressive decline in immune function and the development later of overt clinical signs. No correlation with the analyses performed routinely (hemogram and biochemical profile) has been clearly linked to FIV infection. The electrophoretogram is an indicator of a variety of changes in the serum proteins that may

occur during the course of infection and has also been proposed as a prognostic tool in other species (MIRO et al., 2007).

Hematological and biochemical values in cats naturally infected by FIV have not been documented completely (GLEICH; HARTMANN, 2009), even less so in Brazil. In later stages of FIV infection in naturally infected animals, leucopenia and anaemia are common findings (ISHIDA et al., 1989; SHELTON et al., 1990). Lymphopenia and neutropenia are frequently observed hematological abnormalities in FIV infected cats (SHELTON et al., 1990; LINENBERGER et al., 1995; HOFMANN-LEHMANN et al., 1997). In contrast, the FIV-infected cats in the present study were less likely to be leukopenic and leukocytes count above the reference range were more commonly seen (Fig. 4). Neutrophilia was marked in cats infected with FIV in the fourth blood sampling of the study. Disruption of the immune system function by FIV may serve to promote virus survival (TOMPKINS; TOMPKINS, 2008), accounting for the neutrophilia. Several mechanisms leading to immune dysfunction have been proposed, including cytokine dysregulation, immunologic anergy and increased apoptosis and inappropriate activation of immune regulatory cells (ASCHER; SHEPPARD, 1990; TOMPKINS; TOMPKINS, 2008). In the present study, many variables like other pathogens, age, sex, and surroundings may play an important role under field conditions.

FIV can cause hematologic disorders directly and indirectly (FUJINO et al., 2009). Anemia of chronic disease, due to concurrent infections or neoplasia, with resultant abnormalities in iron usage and RBC survival is another mechanism that causes nonregenerative anemia in retrovirus-infected cats (LINENBERGER; ABKOWITZ, 1995). In the present study, anemia was seen in FIV-positive cats in the last blood sampling (Figure 2). Previous studies proposed that these hematological manifestations could explain why FIV infection into hematopoietic precursors and bone marrow (BM) stromal cells may induce myelodysplastic changes which cause ineffective hematopoiesis (BEEBE et al., 1992), FIV-infected BM stromal cells can alter hematopoietic ability by growth inhibition of BM cells (LINENBERGER et al., 1995; TANABE; YAMAMOTO, 2001) and FIV related immune modulation could cause immune-mediated destruction of both infected and uninfected blood cells, like as observed in HIV infection (KULKOSKY et al., 2000).

In the present study, serum biochemistry profiles were analyzed. Even with a lack of background information, when the first blood sampling (T_0) of the animals under field conditions were compared with the fourth blood sampling (T_3), statistically significant differences between the samplings were seen in the levels of serum proteins and gammaglobulins (Figure 5 and 6). Although lentiviruses are generally thought to induce

immune suppression, paradoxically there is a generalized state of progressive immune hyperactivation of both B and T cells through the course of the infection (FLYNN et al., 1994). It has been reported that hypergammaglobulinemia is generally observed in FIV+ cats which have been infected for over 19 months (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997). The hypergammaglobulinemia observed in FIV-infected cats was of a polyclonal nature in all cats (data not shown) and it probably corresponds to an increase of immunoglobulin (Ig) G, as the β -globulins fraction (where IgM migrates) was not observed to be altered. FIV-infected cats of the current study had a significantly higher protein concentration caused by higher γ -globulin fraction. This finding is consistent with the polyclonal hypergammaglobulinemia reported in other studies not only under natural conditions (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997), but also in experimentally infected specific pathogen-free cats that were not exposed to other antigens (ACKLEY et al., 1990). Polyclonal B-cell activation and hypergammaglobulinemia has been reported in humans infected with HIV and in cats infected with FIV (LANE et al., 1983; TOMPKINS; TOMPKINS, 2008). These B-cell abnormalities represent antibodies directed against viral and nonviral antigens (SHIRAI; PENDLETON; BERZOFSKY, 1992; FLYNN et al., 1994). Viral proteins acting as superantigens, abnormal T-cell activity, impairment of B-cell responsiveness to T-helper cells, and dysregulation of the cytokine environment are proposed mechanisms in HIV infection, and hypergammaglobulinemia represents a prognostic indicator of disease progression (DE MILITO, 2004). The eletrophoretogram could be an indicator of the variety of changes that may occur in the serum proteins during the course of this infection and apparently may reflect the response to the virus itself. Each of these fractions includes a variety of proteins, which amongst other indications, help to infer the immune response of the animal, particularly in chronic diseases (KAJIKAWA et al., 1999). Possibly, the mutation rate of this virus accounts, at least in part, for the hypergammaglobulinemia, as variants would be constantly emerging inducing the continuous formation of antibodies (MIRO et al., 2007). Also, high gammaglobulin levels correspond to high absolute total WBC numbers, which are also indicative of inflammation. However, other authors have reported that hematological parameter, such as total WBC, did not correlate with the gammaglobulin concentrations (SHELTON et al., 1995). The discrepancies observed may be due to the variability of the virulence of the infective strain.

It is interesting to note that although differences were observed between sequential blood samples collected from the FIV-infected cats most of the values remained within the laboratory references ranges for field cats.

In our study, the disease progression was less pronounced compared to other studies, perhaps reflecting the lower virulence of Brazilian FIV strains. However, these preliminary data may aid in the prognosis or possible clinical evaluation, and improve the clinical follow-up of FIV cases. As the CD4/CD8 ratio is the parameter considered most important for diagnosing immunodeficiency, the serum electrophoretogram may be an inexpensive alternative method as a first approach for the practitioner, instead of the more costly flow cytometry to determine the CD4/CD8 ratio, although further studies to evaluate its use are necessary. Further studies over a longer follow up interval may have revealed more intra-host viral variation and a shift of the phase of the infection, accompanied by changes in the hematological and clinical chemistry parameters. For FIV infection, as in HIV infection, whether differences in viral loads, immune response, and disease progression rate can be attributed to viral or host factors or a combination of both remains unclear.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported from grants 07 04180-2 of the FAPESP (the São Paulo State research funding foundation) and 480330-2007-7 of the CNPq (Brazil's National Research Council).

REFERENCES

- ACKLEY, C. D.; YAMAMOTO, J. K.; LEVY, N.; PEDERSEN, N. C.; COOPER, M. D. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 64, n. 11, p. 5652-5655, Nov, 1990.
- ARION, D.; KAUSHIK, N.; MCCORMICK, S.; BORKOW, G.; PARNIAK, M. A. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. **Biochemistry**, v. 37, n. 45, p. 15908-15917, Nov, 1998.
- ASCHER, M. S.; SHEPPARD, H. W. AIDS as immune system activation. II. The panergic imnesia hypothesis. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 3, n. 2, p. 177-191, 1990.
- BACHMANN, M. H.; MATHIASON-DUBARD, C.; LEARN, G. H.; RODRIGO, A. G.; SODORA, D. L.; MAZZETTI, P.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4241-4253, Jun, 1997.
- BEEBE, A. M.; GLUCKSTERN, T. G.; GEORGE, J.; PEDERSEN, N. C.; DANDEKAR, S. Detection of feline immunodeficiency virus infection in bone marrow of cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 37-49, Dec, 1992.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 87-112, Jan, 1995.
- CALLANAN, J. J.; THOMPSON, H.; TOTH, S. R.; O'NEIL, B.; LAWRENCE, C. E.; WILLETT, B.; JARRETT, O. Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 3-13, Dec, 1992.
- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 953-956, Nov, 2006.
- DE MILITO, A. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. **Current HIV Research** v. 2, n. 1, p. 11-21, Jan, 2004.
- DE PARSEVAL, A.; NGO, S.; SUN, P.; ELDER, J. H. Factors that increase the effective concentration of CXCR4 dictate feline immunodeficiency virus tropism and kinetics of replication. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9132-9143, Sep, 2004.
- DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5169, Aug, 1996.

ELDER, J. H.; SUNDSTROM, M.; DE ROZIERES, S.; DE PARSEVAL, A.; GRANT, C. K.; LIN, Y. C. Molecular mechanisms of FIV infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 3-13, May, 2008.

ENGLISH, R. V.; JOHNSON, C. M.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. B. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5175-5186, Sep, 1993.

FLYNN, J. N.; CANNON, C. A.; LAWRENCE, C. E.; JARRETT, O. Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Immunology**, v. 81, n. 4, p. 626-630, Apr, 1994.

FUJINO, Y.; HORIUCHI, H.; MIZUKOSHI, F.; BABA, K.; GOTO-KOSHINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 217-225, May, 2009.

GANESHAN, S.; DICKOVER, R. E.; KORBER, B. T.; BRYSON, Y. J.; WOLINSKY, S. M. Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 663-677, Jan, 1997.

GLEICH, S.; HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 3, p. 552-558, May-Jun, 2009.

GREENE, W. K.; MEERS, J.; DEL FIERRO, G.; CARNEGIE, P. R.; ROBINSON, W. F. Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus env genes in isolates from naturally infected cats. **Archives of Virology**, v. 133, n. 1-2, p. 51-62, 1993.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. **Veterinary Journal**, v. 155, n. 2, p. 123-137, Mar, 1998.

HAYWARD, J. J.; RODRIGO, A. G. Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. **Virology Journal**, v. 5, p. 76, 2008.

HAYWARD, J. J.; RODRIGO, A. G. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, n. 1-2, p. 68-74, Mar, 2010.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal Virology**, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, Mar, 2007.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HOLZNAGEL, E.; OSSENT, P.; LUTZ, H. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 1, p. 33-42, Jan, 1997.

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, Jan, 1998.

HOSIE, M. J.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 575-584, Jul, 2009.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 8, p. 302-303, Aug, 2007.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 11, p. 293-297, Sep, 1989.

HU, W. S.; TEMIN, H. M. Retroviral recombination and reverse transcription. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1227-1233, Nov, 1990.

ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TORIYABE, K.; MOTOYOSHI, S.; TOMODA, I.; PEDERSEN, N. C. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 221-225, Jan, 1989.

JOHNSON, P. R.; HIRSCH, V. M. SIV infection of macaques as a model for AIDS pathogenesis. **International Reviews of Immunology**, v. 8, n. 1, p. 55-63, 1992.

KAJIKAWA, T.; FURUTA, A.; ONISHI, T.; TAJIMA, T.; SUGII, S. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 1, p. 91-98, Mar, 1999.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3639-3646, Jun, 1995.

KRAASE, M.; SLOAN, R.; KLEIN, D.; LOGAN, N.; MCMONAGLE, L.; BIEK, R.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline immunodeficiency virus env gene evolution in experimentally infected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, p. 96-106, Mar, 2010.

KULKOSKY, J.; BOUHAMDAN, M.; GEIST, A.; NUNNARI, G.; PHINNEY, D. G.; POMERANTZ, R. J. Pathogenesis of HIV-1 infection within bone marrow cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 37, n. 5-6, p. 497-515, May, 2000.

KUSUMI, K.; CONWAY, B.; CUNNINGHAM, S.; BERSON, A.; EVANS, C.; IVERSEN, A. K.; COLVIN, D.; GALLO, M. V.; COUTRE, S.; SHPAER, E. G.; ET AL. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. **Journal of Virology**, v. 66, n. 2, p. 875-885, Feb, 1992.

KYAW-TANNER, M. T.; ROBINSON, W. F. Quasispecies and naturally occurring superinfection in feline immunodeficiency virus infection. **Archives Virology**, v. 141, n. 9, p. 1703-1713, 1996.

LANE, H. C.; MASUR, H.; EDGAR, L. C.; WHALEN, G.; ROOK, A. H.; FAUCI, A. S. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 309, n. 8, p. 453-458, Aug, 1983.

LARA, V. M.; TANIWAKIII, S. A.; ARAÚJO JR, J. P. Phylogenetic characterization of feline immunodeficiency virus (FIV) isolates from the state of São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 467-470, Nov, 2007.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LINENBERGER, M. L.; ABKOWITZ, J. L. Haematological disorders associated with feline retrovirus infections. **Baillieres Clinical Haematology**, v. 8, n. 1, p. 73-112, Mar, 1995.

LINENBERGER, M. L.; BEEBE, A. M.; PEDERSEN, N. C.; ABKOWITZ, J. L.; DANDEKAR, S. Marrow accessory cell infection and alterations in hematopoiesis accompany severe neutropenia during experimental acute infection with feline immunodeficiency virus. **Blood**, v. 85, n. 4, p. 941-951, Feb, 1995.

MARTINS, A. N.; MEDEIROS, S. O.; SIMONETTI, J. P.; SCHATZMAYR, H. G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R. M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7863-7874, Aug, 2008.

MCGRATH, K. M.; HOFFMAN, N. G.; RESCH, W.; NELSON, J. A.; SWANSTROM, R. Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. **Virus Research**, v. 76, n. 2, p. 137-160, Aug, 2001.

MEYER, P. R.; MATSUURA, S. E.; SO, A. G.; SCOTT, W. A. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13471-13476, Nov, 1998.

MEYERHANS, A.; CHEYNIER, R.; ALBERT, J.; SETH, M.; KWOK, S.; SNINSKY, J.; MORFELDT-MANSON, L.; ASJO, B.; WAIN-HOBSON, S. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 901-910, Sep, 1989.

MIRO, G.; DOMENECH, A.; ESCOLAR, E.; COLLADO, V. M.; TEJERIZO, G.; DE LAS HERAS, A.; GOMEZ-LUCIA, E. Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FeLV) infections. **Journal of Veterinary Medicine Series A Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 54, n. 4, p. 203-209, May, 2007.

OLMSTED, R. A.; HIRSCH, V. M.; PURCELL, R. H.; JOHNSON, P. R. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 20, p. 8088-8092, Oct, 1989.

PANCINO, G.; FOSSATI, I.; CHAPPEY, C.; CASTELOT, S.; HURTREL, B.; MORAILLON, A.; KLATZMANN, D.; SONIGO, P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, v. 192, n. 2, p. 659-662, Feb, 1993.

PECORARO, M. R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 77, Pt. 9, n., p. 2031-2035, Sep, 1996.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 4790, p. 790-793, Feb, 1987.

PISTELLO, M.; CAMMAROTA, G.; NICOLETTI, E.; MATTEUCCI, D.; CURCIO, M.; DEL MAURO, D.; BENDINELLI, M. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. **The Journal of General Virology**, v. 78, Pt. 9, p. 2247-2257, Sep, 1997.

PRESTON, B. D.; DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 16-21, Jan, 1996.

SCHACKER, T. W.; HUGHES, J. P.; SHEA, T.; COOMBS, R. W.; COREY, L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 8, p. 613-620, Apr, 1998.

SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L.; GRANT, C. K.; ABKOWITZ, J. L. Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 76, n. 6, p. 1104-1109, Sep, 1990.

SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L.; PERSIK, M. T.; ABKOWITZ, J. L. Prospective hematologic and clinicopathologic study of asymptomatic cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 133-140, May-Jun, 1995.

SHIMOJIMA, M.; MIYAZAWA, T.; IKEDA, Y.; MCMONAGLE, E. L.; HAINING, H.; AKASHI, H.; TAKEUCHI, Y.; HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1192-1195, Feb, 2004.

SHIRAI, M.; PENDLETON, C. D.; BERZOFSKY, J. A. Broad recognition of cytotoxic T cell epitopes from the HIV-1 envelope protein with multiple class I histocompatibility molecules. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 6, p. 1657-1667, Mar, 1992.

SIMMONDS, P.; ZHANG, L. Q.; MCOMISH, F.; BALFE, P.; LUCLAM, C. A.; BROWN, A. J. Discontinuous sequence change of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env sequences in plasma viral and lymphocyte-associated proviral populations in vivo: implications for models of HIV pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 65, n. 11, p. 6266-6276, Nov, 1991.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994.

STERLING, T. R.; VLAHOV, D.; ASTEMBORSKI, J.; HOOVER, D. R.; MARGOLICK, J. B.; QUINN, T. C. Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and men. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 10, p. 720-725, Mar, 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANABE, T.; YAMAMOTO, J. K. Phenotypic and functional characteristics of FIV infection in the bone marrow stroma. **Virology**, v. 282, n. 1, p. 113-122, Mar, 2001.

TEIXEIRA, B. M.; LOGAN, N.; CRUZ, J. C.; REIS, J. K.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; HAGIWARA, M. K.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 379-384, Jan, 2010.

TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Lentivirus-induced immune dysregulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 45-55, May, 2008.

WEAVER, E. A.; COLLISON, E. W.; SLATER, M.; ZHU, G. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, Feb, 2004.

WILLETT, B. J.; KRAASE, M.; LOGAN, N.; MCMONAGLE, E. L.; SAMMAN, A.; HOSIE, M. J. Modulation of the virus-receptor interaction by mutations in the V5 loop of feline immunodeficiency virus (FIV) following in vivo escape from neutralising antibody. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 38, 2010.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; RIDHA, S.; HOSIE, M. J. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3386-3394, Apr, 2006.

YAMAMOTO, J. K.; PU, R.; SATO, E.; HOHDATSU, T. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. **Aids**, v. 21, n. 5, p. 547-563, Mar, 2007.

CAPÍTULO VI

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN SAMPLES OF FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

1 INTRODUCTION

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a widespread pathogen of the domestic cat. Cats carrying the virus present with a variety of clinical signs, most notably chronic gingivostomatitis and lymphadenopathy (HOSIE; ROBERTSON; JARRETT, 1989; YAMAMOTO et al., 1989). FIV is a member of the Lentivirus genus of the *Retroviridae* family. Lentiviruses like human immunodeficiency virus (HIV) and FIV are notorious for their extensive genetic variation and for their rapid diversification within a single host (OVERBAUGH; BANGHAM, 2001). In part, this diversification is due to the virus having a rapid rate of replication and a high error rate of reverse transcription (MCGRATH et al., 2001). FIV is unique among the non-primate lentiviruses as in its natural host, the domestic cat, it produces a disease similar to AIDS. Since FIV, like human immunodeficiency virus, has a long and variable disease course, it is often difficult to predict the outcome for an infected cat.

The FIV genome consists of three major genes and several smaller regulatory genes. Like other lentiviruses, FIV exhibits extensive genetic variation (ROBERTS; BEBENEK; KUNKEL, 1988; KANN et al., 2007). The *pol* and *gag* genes encode viral enzymes and core proteins respectively, these genes are relatively highly conserved. The *env* gene encodes surface and transmembrane glycoproteins and is highly variable (OLMSTED et al., 1989; TALBOTT et al., 1989; GREENE et al., 1993). Within the *env* gene, nine variable regions have been defined, separated by more conserved regions (PANCINO et al., 1993b). On the basis of analyses of Env variable regions V3-V5, FIV has been classified into five subtypes (A, B, C, D and E) and recombinant strains (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996) the number of subtypes may increase as further studies reveal additional diversity. Recent studies identified distinct groups of FIV isolates from the United States and New Zealand (WEAVER et al., 2004; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007).

The *env* region contains determinants important for cell tropism, cytopathogenicity, infectivity and prominent immunoreactive domains (SIEBELINK et al., 1992; LOMBARDI; BENDINELLI; GARZELLI, 1993; PANCINO et al., 1993a).

The prevalence rates of FIV infection in Brazil has not been evaluated extensively and regional variations are largely unexplored (MARTINS et al., 2008). Larger surveys of Brazilian isolates are required to determine whether FIV isolates in Brazil have evolved within a single subtype. Preliminary work has suggested that subtype B isolates are present in the domestic cat population of Brazil (CAXITO et al., 2006; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010) but a definitive identification of circulating subtypes is essential in order to develop strategies for molecular diagnosis, since the genetic diversity amongst subtypes is high (REGGETI; BIENZLE, 2004) and may lead to diagnostic problems.

A number of factors appear to influence the outcome of FIV infection. Progression of the disease follows a pattern similar to that observed with primate lentiviruses; it begins with a relatively short acute phase defined by an incremental increase in viral load, low-grade fever, weight loss, lymphadenopathy and neutropenia. The acute phase is followed by an asymptomatic period, which may be drawn out for years. It is typified by antiviral immune responses, lower viral titers, and a gradual decline in CD4⁺ cells, although few clinical signs are observed. Finally, the terminal phase is characterized by an immunologic decompensation, a rise in plasma viral load, and clinical signs of immunodeficiency characterized by increased susceptibility to opportunistic infections (ENGLISH et al., 1994; HOSIE; BEATTY, 2007).

Although the principal hallmark of FIV infection is a decrease in CD4⁺ cells, the virus has also been shown to infect a variety of cell types including CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, B lymphocytes, cells of neuronal lineage and a monocyte/macrophage lineage (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996; JOSHI et al., 2005). Joshi et al. (2005) described feline CD4⁺ CD25⁺ T regulatory (Treg) cells with the ability to support FIV replication. Recently a study has shown that feline dendritic cells (DCs) express specific viral receptors for FIV and can be infected by the virus (REGGETI; ACKERLEY; BIENZLE, 2008). The specificity of the virus-receptors interaction is the earliest determinant of cell tropism and a decisive factor in the pathogenesis of viral disease (WILLETT et al., 2006b). FIV is characterized by similar pattern of receptor usage to that of HIV-1; however, CD134 rather than CD4 is the primary receptor, and the subsequent interaction with the co-receptor CXCR4 permits cells entry (SHIMOJIMA et al., 2004). CD134 was originally identified as MRC OX-40, an antigen expressed on activated rat CD4⁺ T cells which belongs to the tumor necrosis factor receptor/nerve growth factor receptor (TNFR/NGFR) superfamily (PATERSON et al., 1987;

MALLETT; FOSSUM; BARCLAY, 1990). The SU of FIV, gp95, binds to activated cells expressing CD134, a 43-kDa receptor. Studies have indicated that FIV infection of certain cells may result solely through binding the co-receptor molecule CXCR4 providing the expression of the chemokine receptor is sufficiently high (DE PARSEVAL; ELDER, 2001). Recent studies have revealed differential utilization of feline CD134 by FIV. Primary isolates of FIV can be categorized into at least two groups on the basis of their interactions with CD134. The expression of the first cysteine-rich domain (CRD1) of feline CD134 alone is sufficient to confer nearly optimal receptor function for infection with strains such as PPR, subtype A, and B2542 (subtype B), although pathogenic primary strains of virus, such as GL8, subtype A, GPGammer (subtype C) and NCSU1 (subtype B) require additional determinants within the second cysteine-rich domain, CRD2, of CD134 (WILLETT et al., 2006a,b). Virus tropism may be influenced by several factors, including the affinity of the viral envelope for the receptor, the level of expression of the receptor molecules, the conformational heterogeneity of the viral envelope and receptors, and/or the presence of attachment cofactors such as heparin sulphate proteoglycans (HSPGs) and the specific C-type lectin expressed in dendritic cells (DC-SIGN) (DE PARSEVAL et al., 2004a,b; WILLETT et al., 2010).

Considerable debate is ongoing about feral cat populations (LURIA et al., 2004). These cats have long been an area of concern in other countries, particularly European countries and in the United States, as evidenced by the frequency of disease prevalence data available. Issues of concern include the welfare of the cats themselves, public nuisances they may cause, their impact on the environment, and their impact on both public health as well as feline health.

The purpose of this study was to isolate and characterize isolates of FIV from an open shelter in Sao Paulo, Brazil.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Open shelter

Cats from an open shelter in São Paulo, Brazil, with reported cases of FIV infection were tested in this study. Blood samples from 55 domestic, short haired cats were collected by jugular venipuncture and placed in serum separator and EDTA treated glass tubes. Serum and whole blood were stored at -80°C until diagnostic testing was performed. FIV infection in cats was determined using a polymerase chain reaction (PCR)-based method to amplify the *gag* gene (HOHDATSU et al., 1998) and the SNAP FIV/FeLV Comb Test, IDEXX™ – Westbrook, EUA to detect antibody.

2.2 Cells and viruses

MYA-1 (MIYAZAWA et al., 1989) and MCC (CHENEY et al., 1990) cells were cultured in RPMI 1640 medium. 293T cells were maintained in Dulbecco's modification of Eagle's medium. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 0.11 mg/mL sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. In addition the medium for MYA-1 cells was supplemented with 100 IU/mL of recombinant human IL-2 (Kindly provided by Drs Hattori and Miyazawa) and 50 µM 2-mercaptoethanol. All media and supplements were obtained from Invitrogen Life Technologies Ltda (Paisley, United Kingdom). Cell lines expressing CD134 and chimeric constructs were maintained in G418 (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). Brazilian isolates of FIV, the subtype B isolates B2542 (DIEHL et al., 1995), NG4, KNG2, TOT1 and TOI1 (SAMMAN et al., 2010) and the subtype A isolate GL8 (HOSIE; JARRETT, 1990), were tested in parallel.

2.3 Collection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and sera – virus isolation –

Blood samples were collected from 11 cats in the open shelter that were naturally infected with FIV. The cats were displaying few clinical signs (analogous to the

asymptomatic stage of HIV infection). Sera were aliquoted and stored at -80°C prior to use in neutralization assays. PBMC were fractionated from 5 mL of heparinised whole blood by centrifugation using Ficoll-Paque density separation medium (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.). The separated PBMCs were then co-cultivated with MYA-1 cells, which are highly susceptible to infection with FIV (MIYAZAWA et al., 1989), without mitogenic stimulation. DNA was prepared from cultures identified as FIV-infected using column chromatography (QIAamp DNA maxiprep Kit; Qiagen) as soon as FIV p24 antigen was detected by ELISA; thus, viruses had undergone minimal passage *in vitro*. Eluted DNAs samples were stored at -20°C.

2.4 Cloning and pseudotype virus production

The FIV envelope glycoprotein gene expression constructs GL8, B2542, NG4, KNG2, TOT1 and TOI1 have been described previously (SHIMOJIMA et al., 2004; WILLETT et al., 2006b; SAMMAN et al., 2010). Full length *env* genes from all Brazilian isolates, replication-competent viruses, were amplified with a proofreading PCR (High Fidelity PCR system; Roche). Primers were designed to incorporate *Sal*-I and *Not*-I restriction enzymes, the *env* genes were then cloned into a low-copy number eukaryotic expression vector, VR1012 (VICAL Inc., San Diego, USA). HIV(FIV) pseudotypes were prepared by transfecting 3.3 x 10⁵ HEK-293T cells with 5µg of the different VR1012/*env* construct together with 5µg of pNL-Luc-E.R+ (CONNOR et al., 1995), an *env*-deleted HIV provirus incorporating a luciferase reporter gene. The transfection was carried out using SuperFect® reagent – Qiagen – following the manufacturer's instructions. Culture supernatants were harvested at 72 hours post-transfection, filtered at 0.45µm and stored at -80°C.

2.5 HIV pseudotype assays

To assess whether CD134 acts as a functional viral receptor and to define the region of CD134 that confers functional FIV receptor activity, we used cell lines derived from the feline large granular lymphoma cell line MCC (CHENEY et al., 1990), cells that are refractory to

infection with primary strains of FIV. MCC cells had been stably transduced with the feline CD134, human CD134, and a feline x human CD134 chimera, F(FH)H (WILLETT et al., 2006b). The target cell lines were seeded at 1×10^4 cells per well in a CulturPlate-96 assay plate (Perkin-Elmer, Life and Analytical Sciences, Beaconsfield, United Kingdom) and cultured overnight. The cells were then infected with 50 μl of each HIV(FIV) luciferase pseudotype and cultured for 72 h until luciferase activity was quantified through the addition of 50 μl of Steadylite HTS luciferase substrate (Perkin-Elmer) and measurements were taken through single photon counting on a MicroBeta Luminometer (Perkin-Elmer).

2.6 PCR product purification and DNA sequencing

PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit, Qiagen. DNA was eluted in nuclease-free water and used immediately or stored at -20°C. Sequencing of the FIV *env* genes was carried out using the Genetic Analyzer AB3130X (Applied Biosystems) and the Big Dye Terminator V1.1 Kit (Applied Biosystems). The reaction mixture consisted of 100 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ purified DNA, 3.2 pmol of each of the primers, 4 μL sequencing buffer and 2 μL sequencing enzyme in 20 μL reactions. Cycling conditions were as per the manufacturer's protocol. Raw chromatographic data were analyzed using 'Contig Express' sequence analysis software within the Vector NTI suite of programs (InVitrogen). Chromatogram traces which appeared to contain multiple peaks were discarded.

2.7 Phylogenetic analysis

Nucleotide sequence analysis was performed on full-length *env* genes. The generated consensus sequence comprised sequences of three Brazilian isolates and reference sequences. Multiple alignments were performed using the ClustalX (LARKIN et al., 2007) and BioEdit, version 7.0.9.0) applications, followed by manual adjustment to maximize similarities. Amino acid alignments were used as an exact guide for re-positioning of improper gapping, particularly where sequences differed in length. Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method. Robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis on

1000 replicates to assess the support at each of the internal nodes of the neighbour-joining tree. The phylogenetic tree was submitted for final editing and graphical representation using MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

2.8 Nucleotide sequence accession numbers

The FIV sequences included in the study were as follows (GenBank accession number, name of isolates, country and subtype of FIV *env* sequences): L00608.1, Dixon, United States, A; L00607.1, Dixon, United States, A; NC_001482.1, refseq fiv, United States, A; M25381.1, Petaluma, United States, A; X69496.1, UK8, England, A; M36968.1, PPR, United States, A; D37814.1, Sendai 2, Japan, B; D37817.1, Aomori 2, Japan, B; FJ374696, Leviano C1, Brazil, B; FJ374697, Leviano C7, Brazil, B; FJ374695, Leviano C8, Brazil, B; AF474246.1, Canada, C; D37815.1, Fukuoka, Japan, D; D37811.1, Shizuoka, Japan, D. All sequences reported in this study have been deposited in GenBank.

3 RESULTS

Five of 55 cats (9.09%) tested positive for both feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). The seroprevalence of FIV in the open shelter tested in this study was 50.90% (28/55), based on FIV ELISA and PCR results (Figure 1). We observed that 41.82% (23/55) of the cats from this open shelter were infected with FIV but were not co-infected with FeLV.

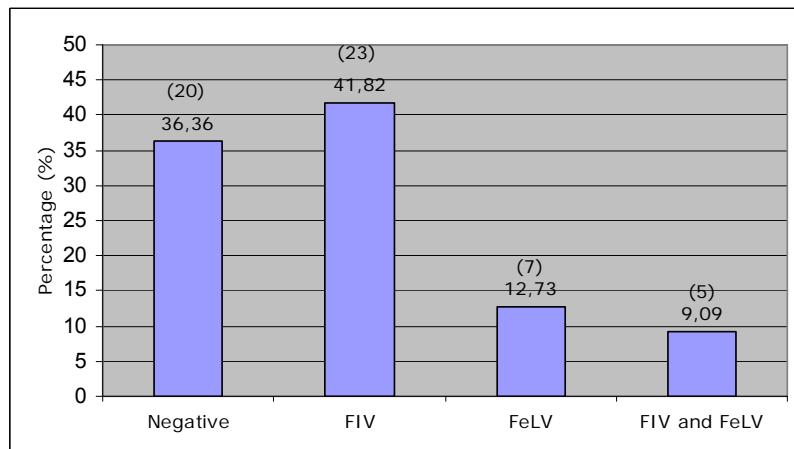


Figure 1 - Frequency of retrovirus infections in cats from an open shelter in Brazil. Numbers in parentheses indicate number of cats

We prepared 11 isolates of FIV from samples collected from Brazilian cats. Sequence analyses demonstrated that all clones belonged to subtype B. Unexpectedly, little sequence variation was observed in circulating viruses isolated from the infected cats but, as described previously (TEIXEIRA et al., 2010), the sequences of clones obtained from one cat (Didi) were heterogeneous (Figure 2). Analysis of isolates from patients demonstrated that intra-patient isolates were more closely related than inter-patient isolates and that intra-patient isolates evolved over time.

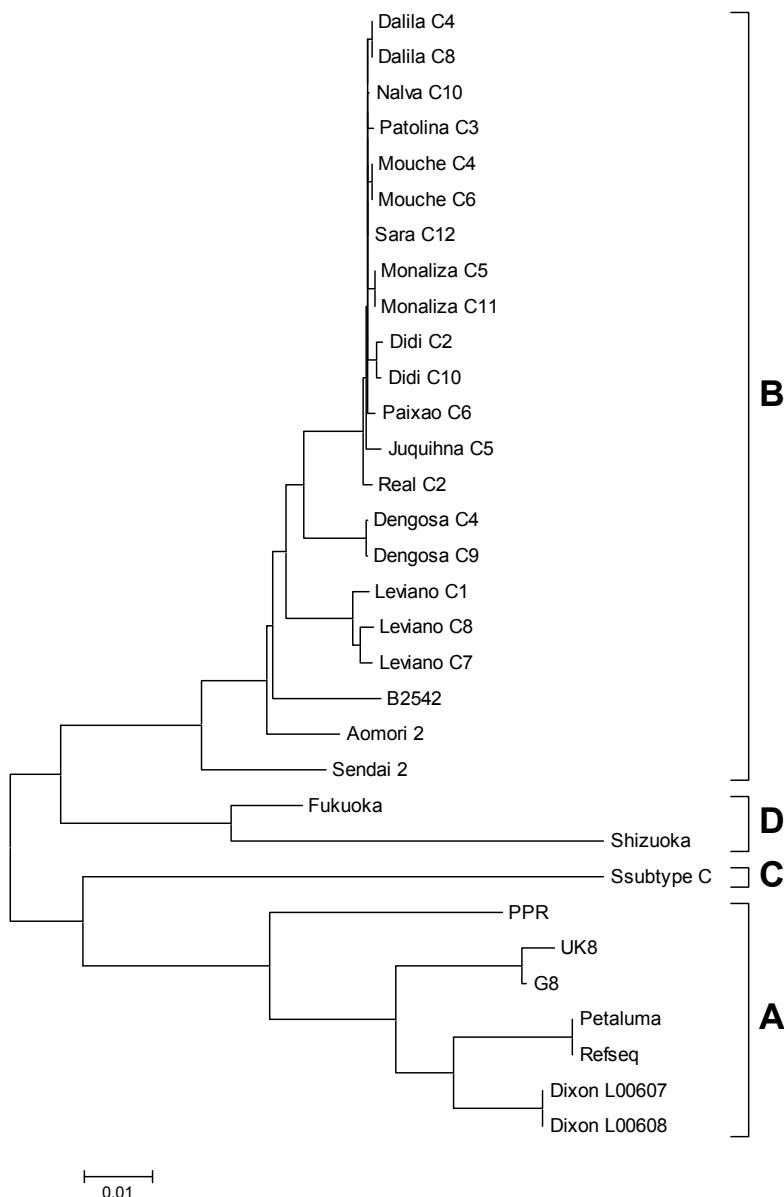


Figure 2 - Phylogenetic tree of full-length viral envelope glycoprotein (*env*) genes from the FIV. The subtype was determined by phylogenetic analyses – an unrooted Neighbour-joining tree with Kimura 2-parameter, bootstrap analysis with 1000 iterations

The receptor usage of each of the variant *env* clones was assessed *in vitro*. All Brazilian isolates of FIV used CD134 as the primary receptor and we tested the interaction of each strain with the receptor. In contrast to the virulent primary isolate FIV-GL8, expression of the first cysteine-rich domain (CRD1) of feline CD134 in the context of human CD134 was sufficient for optimal receptor function for all Brazilian FIV isolates tested – ratios obtained by dividing the luciferase activity of each pseudotype on feCD134-expressing cells by that on feCRD1-expressing cells (Figure 3).

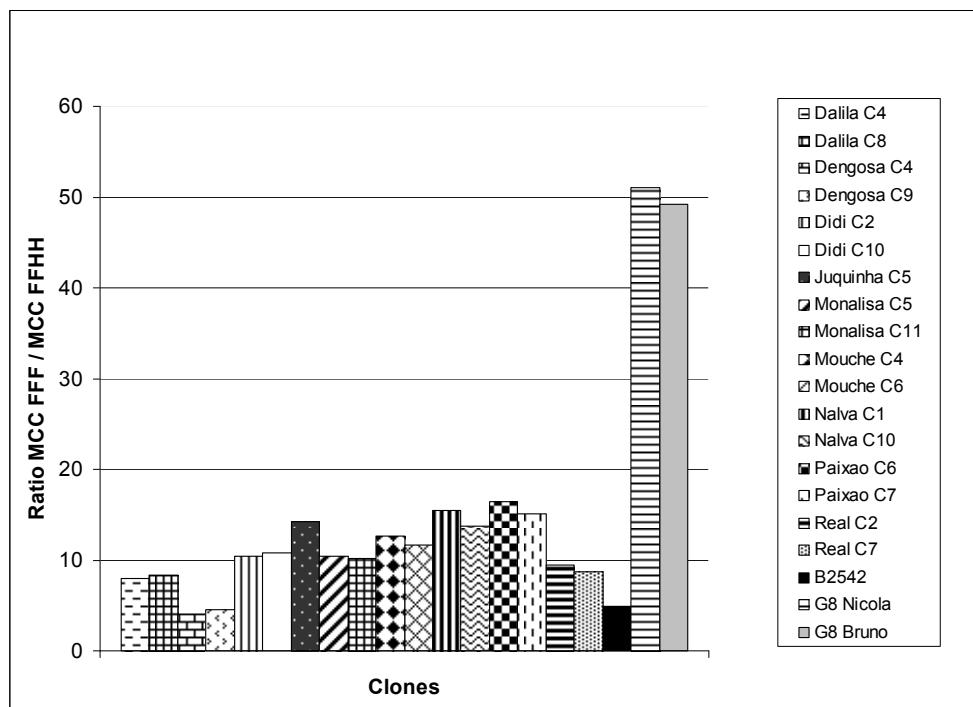


Figure 3 - Utilization of CD134 chimeras by FIV strains. MCC cells stably transduced with a retroviral vector (pDONAI) bearing each of the chimeras, FFF and F(FH)H, were infected with HIV (FIV) luciferase pseudotypes bearing the GL8 and Brazilian isolate *Env*s. Luciferase activities were assayed at 72 h postinfection and are expressed as ratios derived by dividing the mean ($n = 3$) counts per minute (CPM) on feCD134-expressing cells by the CPM on feCRD1-expressing (cells)

For purposes of comparison, we examined the receptor utilization of diverse subtype B strains of FIV, in order to discern whether these isolates of FIV interacted with CD134 in a similar way. All subtype B strains tested in this study required the expression of feline CD134 CRD1 alone for infection.

4 DISCUSSION

In our study, the prevalence of FIV was higher than that published previously for cats in Brazil (RECHE JR; HAGIWARA; LUCAS, 1997; SOUZA; TEIXEIRA; GRAÇA, 2002; CAXITO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; LARA; TANIWAKI; ARAUJO JUNIOR, 2008); the frequency of FIV was up to 50% in the shelter cats. This result is higher than highest seroprevalence found in sick cats in a population sampled in Japan (ISHIDA et al., 1989) and should be interpreted with caution as the samples came from just one shelter and the cats had been feral before being placed in the shelter or were free-roaming strays, which a consequent lack of confinement and ownership. It is known that the prevalence of FIV infection is greater in such cats. Hence the cats assessed in the study appear to be of greater risk of infection with FIV compared to other cats and represent an important reservoir for this retrovirus.

To characterize Brazilian FIV isolates, our study focused on the *env* gene since this gene encodes the surface unit (SU) glycoprotein, which plays a key role in viral entry and is a target of both humoral and cellular responses (WILLETT; HOSIE, 2008). In most studies, intrahost sequence variation has been assessed based on sequence analyses of PCR amplicons obtained using DNA isolated from the PBMC of infected cats as a template, analysing therefore the most abundant proviral genomes rather than the full repertoire of virus sequences in circulation. For this reason, we cloned all Brazilian variants detected. Our analyses demonstrated that all clones grouped within subtype B (Figure 2). It is important to remember that since neither the prevalence of FIV infection in Brazil, nor all prevailing subtypes are known, the determination of prevalence of infection in cats in all Brazilian regions will be important to establish. The majority of studies have been concentrated in one area, namely the Brazilian south-east (MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010).

The existence of multiple variants (or quasispecies) of FIV has been reported previously (HUISMAN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010) as well as in this study; FIV demonstrates a relatively high evolutionary rate, attributed largely to substitution errors made during reverse transcription. However, there is also evidence that viruses evolve under selection pressure to both evade the host immune response and to achieve higher levels of replication fitness. Consequently, lentiviruses such as FIV and HIV undergo continual evolution in the host. FIV evolution during the chronic phase of infection is potentiated by the high levels of virus replication and the inherent error-prone nature of reverse transcription. At

any given time, the virus population within a FIV infected cat is heterogeneous and dynamic. Longer term monitoring will be necessary to establish whether this sequence diversity leads to a more significant and effective population size that could impact upon viral evolution and viral fitness. It is unclear to what extent the genetic variation of FIV that was observed in these isolates was influenced by the properties of the infecting strain, the level of replication, or the immune response to the virus.

Assays to determine receptor utilization demonstrated that, similar to other isolates of FIV (WILLETT et al., 2006b), the Brazilian isolates in this study used CD134 as the primary receptor in conjunction with the chemokine co-receptor CXCR4 for infection (SHIMOJIMA et al., 2004). Furthermore, for the Brazilian strains, the CDR1 of fCD134 (amino acids 1 to 64) alone was sufficient to confer nearly optimal receptor function. Preliminary works have suggested that subtype B isolates are present in the domestic cat population of Brazil (CAXITO et al., 2006; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2010) and an another study (WILLETT et al., 2006b) has indicated a minimal requirement in the CRD1 of feline CD134 for the B2542 isolate, a subtype B virus that may be more host-adapted and more readily neutralized by the host humoral response. Subtype B isolates appear to require a less stringent interaction with the primary receptor for infection to proceed compared to the pathogenic primary strains of virus, such as GL8; this subtype A isolate dominates in early infection and requires additional determinants on the primary receptor, included within the second cysteine-rich domain, CRD2, in order to form a functional receptor, requiring a “complex” interaction (WILLETT et al., 2006a,b). It is important to remember that in the FIV infection the provirus levels are higher in CD4⁺ T cells during the acute phase of infection, while B cells contain the majority of provirus during the chronic phase (ENGLISH et al., 1993; DEAN et al., 1996). With disease progression it is possible that FIV may either lose its dependence on binding to CD134 or interact more efficiently with CXCR4 (WILLETT; HOSIE, 2008). Whether there is a link between the nature of the *Env*-CD134 interaction and the broadening of viral cell tropism with disease progression is a topic of on-going research. An analysis of variants in follow-up samples from the FIV-infected cats tested in this study would assist in this endeavour.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported from grants 07 04180-2 of the FAPESP (the São Paulo State research funding foundation), 480330-2007-7 of the CNPq (Brazil's National Research Council) and Public Health Service grant AI049765 to B.J.W and M.J.H from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

REFERENCES

- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 8, p. 953-956, Nov, 2006.
- CHENEY, C. M.; ROJKO, J. L.; KOCIBA, G. J.; WELLMAN, M. L.; DI BARTOLA, S. P.; REZANKA, L. J.; FORMAN, L.; MATHES, L. E. A feline large granular lymphoma and its derived cell line. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 26, p. 455-463, 1990.
- CONNOR, R. I.; CHEN, B. K.; CHOE, S.; LANDAU, N. R. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. **Virology**, v. 206, p. 935-944, 1995.
- DE PARSEVAL, A.; ELDER, J. H. Binding of recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoprotein to feline cells: role of CXCR4, cell-surface heparans, and an unidentified non-CXCR4 receptor. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, p. 4528-4539, May, 2001.
- DE PARSEVAL, A.; CHATTERJI, U.; SUN, P.; ELDER, J. H. Feline immunodeficiency virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 35, p. 13044-13049, Aug, 2004b.
- DE PARSEVAL, A.; NGO, S.; SUN, P.; ELDER, J. H. Factors that increase the effective concentration of CXCR4 dictate feline immunodeficiency virus tropism and kinetics of replication. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9132-9143, Sep, 2004a.
- DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5169, Aug, 1996.
- DIEHL, L. J.; MATHIASON-DUBARD, C. K.; O'NEIL, L. L.; HOOVER, E. A. Longitudinal assessment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a quantitative competitive reverse transcriptase PCR. **Journal of Virology**, v. 69, p. 2328-2332, 1995.
- ENGLISH, R. V.; JOHNSON, C. M.; GEBHARD, D. H.; TOMPKINS, M. B. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 9, p. 5175-5186, Sep, 1993.
- ENGLISH, R. V.; NELSON, P.; JOHNSON, C. M.; NASISSE, M.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 3, p. 543-552, Sep, 1994.
- GREENE, W. K.; MEERS, J.; DEL FIERRO, G.; CARNEGIE, P. R.; ROBINSON, W. F. Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus env genes in isolates from naturally infected cats. **Archives of Virology**, v. 133, n. 1-2, p. 51-62, 1993.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal of Virology**, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, Mar, 2007.

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, Jan, 1998.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 8, p. 302-303, Aug, 2007.

HOSIE, M. J.; JARRETT, O. Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. **Aids**, v. 4, p. 215-220, 1990.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 11, p. 293-297, Sep, 1989.

HUISMAN, W.; SCHRAUWEN, E. J.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. Intrahost evolution of envelope glycoprotein and OrfA sequences after experimental infection of cats with a molecular clone and a biological isolate of feline immunodeficiency virus. **Virus Research**, v. 137, n. 1, p. 24-32, Oct, 2008.

ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TORIYABE, K.; MOTOYOSHI, S.; TOMODA, I.; PEDERSEN, N. C. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 221-225, Jan, 1989.

JOSHI, A.; GARG, H.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Preferential feline immunodeficiency virus (FIV) infection of CD4+ CD25+ T-regulatory cells correlates both with surface expression of CXCR4 and activation of FIV long terminal repeat binding cellular transcriptional factors. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 4965-4976, Apr, 2005.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 6, p. 3639-3646, Jun, 1995.

KANN, R.; SEDDON, J.; KYAW-TANNER, M.; MEERS, J. Co-infection with different subtypes of feline immunodeficiency virus can complicate subtype assignment by phylogenetic analysis. **Archives of Virology**, v. 152, n. 6, p. 1187-1193, 2007.

LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAUJO JUNIOR, J. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2245-2249, 2008.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LOMBARDI, S.; BENDINELLI, M.; GARZELLI, C. Detection of B epitopes on the p24 gag protein of feline immunodeficiency virus by monoclonal antibodies. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 2, p. 141-146, Feb, 1993.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 287-296, 2004.

MALLETT, S.; FOSSUM, S.; BARCLAY, A. N. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. **The Embo Journal**, v. 9, n. 4, p. 1063-1068, Apr, 1990.

MARTINS, A. N.; MEDEIROS, S. O.; SIMONETTI, J. P.; SCHATZMAYR, H. G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R. M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naive cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7863-7874, Aug, 2008.

MCGRATH, K. M.; HOFFMAN, N. G.; RESCH, W.; NELSON, J. A.; SWANSTROM, R. Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. **Virus Research**, v. 76, n. 2, p. 137-160, Aug, 2001.

MIYAZAWA, T.; FURUYA, T.; ITAGAKI, S.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 108, n. 1-2, p. 131-135, 1989.

OLMSTED, R. A.; HIRSCH, V. M.; PURCELL, R. H.; JOHNSON, P. R. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 20, p. 8088-8092, Oct, 1989.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C. R. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1106-1109, May 11, 2001.

PANCINO, G.; CHAPPEY, C.; SAURIN, W.; SONIGO, P. B epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 67, n. 2, p. 664-672, Feb, 1993a.

PANCINO, G.; FOSSATI, I.; CHAPPEY, C.; CASTELOT, S.; HURTREL, B.; MORAILLON, A.; KLATZMANN, D.; SONIGO, P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, v. 192, n. 2, p. 659-662, Feb, 1993b.

PATERSON, D. J.; JEFFERIES, W. A.; GREEN, J. R.; BRANDON, M. R.; CORTHESY, P.; PUKLAVEC, M.; WILLIAMS, A. F. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. **Molecular Immunology**, v. 24, n. 12, p. 1281-1290, Dec, 1987.

PECORARO, M. R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; SUGITA, S.; TOHYA, Y.; KAI, C.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; MIKAMI, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 77, Pt. 9, n., p. 2031-2035, Sep, 1996.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, p. 152-155, 1997.

REGGETI, F.; ACKERLEY, C.; BIENZLE, D. CD134 and CXCR4 expression corresponds to feline immunodeficiency virus infection of lymphocytes, macrophages and dendritic cells. **The Journal of General Virology**, v. 89, Pt. 1, p. 277-287, Jan, 2008.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. **The Journal of General Virology**, v. 85, Pt. 7, p. 1843-1852, Jul, 2004.

ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1171-1173, Nov, 1988.

SAMMAN, A.; LOGAN, N.; MCMONAGLE, E. L.; ISHIDA, T.; MOCHIZUKI, M.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Neutralization of feline immunodeficiency virus by antibodies targeting the V5 loop of Env. **The Journal of General Virology**, v. 91, Pt. 1, p. 242-249, Jan, 2010.

SHIMOJIMA, M.; MIYAZAWA, T.; IKEDA, Y.; MCMONAGLE, E. L.; HAINING, H.; AKASHI, H.; TAKEUCHI, Y.; HOSIE, M. J.; WILLETT, B. J. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1192-1195, Feb, 2004.

SIEBELINK, K. H.; CHU, I. H.; RIMMELZWAAN, G. F.; WEIJER, K.; OSTERHAUS, A. D.; BOSCH, M. L. Isolation and partial characterization of infectious molecular clones of feline immunodeficiency virus obtained directly from bone marrow DNA of a naturally infected cat. **Journal Virology**, v. 66, n. 2, p. 1091-1097, Feb, 1992.

SODORA, D. L.; SHPAER, E. G.; KITCHELL, B. E.; DOW, S. W.; HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, v. 68, n. 4, p. 2230-2238, Apr, 1994.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Epidemiological study of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic cats in the city of Rio de Janeiro **Clínica Veterinária**, v. 36, p. 14-21, 2002.

TALBOTT, R. L.; SPARGER, E. E.; LOVELACE, K. M.; FITCH, W. M.; PEDERSEN, N. C.; LUCIW, P. A.; ELDER, J. H. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 15, p. 5743-5747, Aug, 1989.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, B. M.; LOGAN, N.; CRUZ, J. C.; REIS, J. K.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; HAGIWARA, M. K.; WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 379-384, Jan, 2010.

TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, Aug, 2007.

WEAVER, E. A.; COLLISON, E. W.; SLATER, M.; ZHU, G. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal Virology**, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, Feb, 2004.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 56-64, May, 2008.

WILLETT, B. J.; KRAASE, M.; LOGAN, N.; MCMONAGLE, E. L.; SAMMAN, A.; HOSIE, M. J. Modulation of the virus-receptor interaction by mutations in the V5 loop of feline immunodeficiency virus (FIV) following in vivo escape from neutralising antibody. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 38, 2010.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; BONCI, F.; PISTELLO, M.; HOSIE, M. J. Mapping the domains of CD134 as a functional receptor for feline immunodeficiency virus. **Journal Virology**, v. 80, n. 15, p. 7744-7747, Aug, 2006a.

WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; RIDHA, S.; HOSIE, M. J. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. **Journal Virology**, v. 80, n. 7, p. 3386-3394, Apr, 2006b.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 213-220, Jan, 1989.

CAPITULO VII

CONCLUSÕES

- Todas as amostras do vírus da imunodeficiência estudadas do abrigo do estudo pertencem ao subtipo B.
- Isolados do FIV, do presente estudo, apresentam quasispecies virais heterogêneas.
- Durante o período de 15 meses que foi realizado o estudo, o segmento do gene envelope (*env*) viral analisado, V4-V6, das amostras do estudo apresentaram baixa divergência.
- Durante o período de 15 meses que foi realizado o estudo, na fase crônica assintomática da doença provocada pelas amostras do FIV, no abrigo do estudo, não foi possível verificar se a progressão da doença provocada pelo vírus é influenciada pela evolução viral.
- O Hemograma, a proteína sérica total e a avaliação do perfil eletroferético das proteínas séricas são testes importantes na avaliação da evolução clínica da doença nos animais infectados pelo FIV.
- Todos isolados do estudo utilizam o CD134 como receptor primário. A expressão do primeiro domínio rico em cisteina (CRD1) do receptor CD134 felino foi suficiente para todos isolados brasileiros do estudo estabelecerem a infecção celular.

ANEXO A – (A) Equipe de trabalho em um dia de coleta. **(B)** Animais do grupo dos positivos para o FIV.



APÊNDICE A – Identificação dos felinos, sexo e resultados dos testes de diagnóstico para a infecção pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV)

Número	Nome	Sexo	FIV	FeLV
1	Shell	Fêmea	Negativo	Negativo
2	Anastácia	Fêmea	Positivo	Negativo
3	Scot	Macho	Positivo*	Negativo
4	Belinha	Fêmea	Negativo	Negativo
5	Carnaval	Macho	Positivo	Negativo
6	Nalva	Fêmea	Positivo*	Negativo
7	Vânia	Fêmea	Negativo	Negativo
8	Shenia	Fêmea	Negativo	Negativo
9	Cone	Fêmea	Negativo	Negativo
10	Índia	Fêmea	Negativo	Negativo
11	Miau-Miau	Fêmea	Negativo	Negativo
12	Paixão	Fêmea	Positivo*	Negativo
13	Bethoven	Macho	Positivo	Negativo
14	Jujuquinha	Macho	Positivo*	Negativo
15	Real	Macho	Positivo*	Negativo
16	Tiririca	Macho	Positivo	Negativo
17	Mouche	Fêmea	Positivo*	Negativo
18	Dengosa	Fêmea	Positivo*	Negativo
19	Monaliza	Fêmea	Positivo*	Negativo
20	Carminha	Fêmea	Positivo	Negativo
21	Moreno	Macho	Positivo	Negativo
22	Raimundo	Macho	Positivo*	Negativo
23	Sara	Fêmea	Positivo*	Negativo
24	Kennedy	Macho	Positivo	Negativo
25	Virgula	Fêmea	Negativo	Positivo
26	Melissa	Fêmea	Negativo	Positivo
27	Celinho	Macho	Negativo	Positivo
28	Mãezinha	Fêmea	Positivo	Positivo
29	Pinoche	Macho	Negativo	Negativo
30	Mixirica	Fêmea	Negativo	Negativo
31	Didi	Macho	Positivo*	Negativo
32	Sansão	Macho	Negativo	Positivo
33	Dalila	Fêmea	Positivo*	Negativo
34	Popeye	Macho	Negativo	Negativo
35	Marcelão	Macho	Negativo	Negativo
36	Tom-Tom	Macho	Positivo	Positivo
37	Patolina	Fêmea	Positivo*	Negativo
38	Crica	Fêmea	Negativo	Negativo
39	Romão	Macho	Positivo	Positivo
40	Madalena	Fêmea	Positivo	Negativo
41	Valéria	Fêmea	Negativo	Negativo
42	Vicky	Fêmea	Negativo	Negativo
43	Deusa	Fêmea	Negativo	Negativo
44	Camila	Fêmea	Positivo	Negativo
45	Rabudo	Macho	Positivo	Positivo
46	Tigradinha	Fêmea	Positivo	Positivo
47	Xaninha	Fêmea	Positivo	Positivo
48	Cris	Fêmea	Negativo	Negativo
49	Beija-flor	Macho	Negativo	Negativo
50	Quindin	Fêmea	Negativo	Negativo
51	Kátia	Fêmea	Negativo	Negativo
52	Lolô	Macho	Negativo	Negativo
53	Eva	Fêmea	Negativo	Positivo
54	Lolinha	Fêmea	Negativo	Positivo
55	Ofélia	Fêmea	Negativo	Negativo

*Felinos infectados pelo FIV dos quais se realizou a tentativa de isolamento e clonagem do vírus.

APÊNDICE B - Protocolos e técnicas utilizadas no estudo.

1 COLETA

As amostras de sangue total foram coletadas por venipunctura jugular; uma alíquota foi colocada em tubos contendo EDTA a 7,5 % (Vacutainer® Becton Dickinson, USA), e outra em tubos estéreis sem anticoagulantes, para obtenção do soro. Os soros sanguíneos obtidos após a separação do coágulo foram conservados a -20°C até o momento da realização das provas bioquímicas e sorológicas. As alíquotas de sangue colocadas no EDTA foram encaminhadas para a realização do hemograma completo; em seguida, para extração e análise do material genético, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

2 HEMOGRAMA

A quantificação de hemácias, plaquetas e de leucócitos e a concentração de hemoglobina foi realizada em contador automático (ABC Vet®, ABX Diagnostics, França). O volume globular (hematócrito) foi aferido pela técnica de microhematócrito. Os esfregaços de sangue, preparados com sangue fresco no momento da coleta, foram corados pelo método de Rosenfeld e examinados em microscópio óptico, com objetiva de imersão (1000x), para a contagem diferencial dos leucócitos e avaliação morfológica das células sanguíneas. As análises hematológicas foram realizadas no máximo em doze horas, após a coleta.

3 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Foram determinadas as concentrações séricas de uréia, creatinina, proteína sérica total, albumina e as atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). Nos soros

ictéricos foram obtidos os valores de bilirrubina total, direta e indireta. Todas as mensurações foram realizadas em um analisador bioquímico automático (LIASYS®, AMS – Analyser Medical System, Roma, Itália).

4 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

Para a realização da eletroforese de proteínas, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo, mantidos a – 20º C até o momento do processamento. As tiras de acetato de celulose (Biosystems®) foram rehidratadas em tampão tris-veronal (Electra HR Buffer, Helena Laboratories®) e posteriormente, após a aplicação das amostras, submetidas a corrente fixa de 200V e 3.5mA por 35 minutos em cuba eletroforética (Biosystems®). As corridas foram analisadas em programa computacional Multi Analyst do densitômetro Bio-rad® (model GS-700 Imaging Densitometer).

5 TESTE SOROLÓGICO (ELISA)

O teste sorológico ELISA foi utilizado. Trata-se de um *kit* comercial baseado no ensaio de imunoadsorção enzimática - SNAP COMBO FIV-FeLV®, IDDEXX Laboratories, para detecção de antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) e anticorpos anti-FIV. A identificação dos felinos, sexo e resultados desse teste de diagnósticos para a infecção pelo vírus da imunodeficiência dos felinos e vírus da leucemia felina estão demonstrados no quadro do apêndice B. A demonstração de anticorpos séricos frente às proteínas do vírus nos gatos infectados tem sido, na atualidade, o meio de diagnóstico mais empregado para a detecção da infecção pelo FIV.

6 PESQUISA DE ANTÍGENOS VIRAIS DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV)

Para a pesquisa de antígenos virais do FeLV, foi realizada também a reação de imunofluorescência indireta (VMRD Inc. Pullmann-Albion Road, Pullman) em esfregaços de sangue fresco. As reações foram realizadas no máximo em 7 dias. Em cada lâmina de esfregaço sanguíneo foram demarcadas duas áreas circulares de aproximadamente um centímetro de diâmetro, utilizando-se caneta esferográfica de tinta metálica. O círculo da esquerda correspondia ao controle negativo, no qual foram colocados 10 µl de tampão PBS com 1% de soroalbumina bovina. No círculo da direita foram colocados 10µl de anticorpos anti-VLF, reagente primário para FeLV, VMRD, Inc. Para cada grupo de lâminas testadas foi utilizada uma lâmina sabidamente positiva, como controle positivo da reação. As lâminas foram incubadas a 37°C em câmera úmida, por 30 minutos, a seguir mergulhadas rapidamente em tampão de lavagem diluído em água destilada na proporção 1:4, para retirar o excesso de reagente, imersas neste tampão por mais 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada, e deixadas na posição inclinada para drenagem do excesso de líquido. Após a secagem, foram adicionados 10ul do conjugado anti-IgG – fluoresceína, reagente secundário, em cada sítio, repetindo-se as etapas de incubação e lavagem. Terminada a reação, as lâminas foram cobertas com uma gota de glicerina tamponada e montadas com lamínulas de vidro. Para a leitura da reação foi utilizado microscópio de fluorescência, Microscópio *OLYMPUS BX60*, com epi-iluminação. A amostra foi considerada positiva quando os leucócitos e plaquetas apresentaram nítida fluorescência (JUNQUEIRA-JORGE, 2005). Esses exames foram realizados no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

7 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA viral foi extraído do sangue total através do kit comercial de extração DNA Ilustra™ Blood GenomicPrep Mini, GE Helthcare, de acordo com as recomendações do fabricante. Após extração, a concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria, a 260 nm de comprimento de onda. As amostras de DNA extraídas foram conservadas a – 20°C até o momento da realização das provas moleculares. As extrações do DNA foram realizadas no máximo em vinte e quatro horas.

8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Amplificação do gene *gag*

Como teste molecular de diagnóstico para o FIV, foi utilizada uma PCR objetivando amplificar fragmentos de 329 pares de bases (pb) do gene *gag* (posição 1036-1364), correspondente à região P17-P24 deste gene (APÊNDICE C). Os iniciadores foram os descritos por Hodatsu e colaboradores em 1998 (HOHDATSU et al., 1998), apêndice D. Os dois pares de iniciadores foram desenhados com o auxílio dos programas Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), Oligo Primer Analysis (National Biosciences, Inc.) e Oligotech Versão 1.0 (<http://www.oligosec.com/OLIGOTech.HTM>).

A amplificação foi realizada no termociclador (Bio-Rad DNA Engine®, Peltier Thermal Cycler, EUA) com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 58°C por 1 minuto para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a extensão das fitas, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para extensão final. Como controle positivo das reações moleculares para a detecção do DNA do FIV foi utilizada amostra do vírus gentilmente cedida pelo laboratório Retrolab®, Escola de Veterinária – UFMG - Belo Horizonte, MG (TEIXEIRA et al., 2007).

9 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Amplificação do gene *env*

Para a amplificação dos fragmentos do gene *env* (região hipervariável do vírus) foi desenhado um par de iniciadores como o descrito para o gene *gag*. Foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores que objetivaram amplificar fragmentos de 862 pares de bases (pb), 287 aminoácidos, gene *env* (posição 7320-8182) em que se encontra a região V3-V6. Os

iniciadores, *primers*, estão descritos no apêndice E. Na apêndice F, é apresentada a localização dos genes do FIV.

A amplificação foi realizada no termociclador (Bio-Rad DNA Engine®, Peltier Thermal Cycler, EUA) com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 58°C por 45 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos para extensão final. Em todas as reações houve um tubo de controle dos reagentes, um controle negativo e um positivo. Como controle positivo das reações moleculares do gen *env* do FIV foi utilizada uma amostra do vírus gentilmente cedida pela Professora Margaret J. Hosie, do *Retrovirus Research Laboratory*, Universidade de Glasgow.

Para definição da temperatura de anelamento dos *primers*, desenhados para o *env*, foram realizadas PCRs com gradiente de temperatura, diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*, +5°C/55°C, com diferentes amostras positivas (APÊNDICE G).

10 ELETOFORESE

Após as amplificações os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, conforme a técnica que se segue: dez microlitros do produto amplificado em cada PCR foram submetidos à eletroforese (100V e 400 m. a. por 40 minutos) em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 1X (tris, borato e EDTA 0,1X), contendo brometo de etídeo (0,5 microgramas/ml). Em cada corrida foi incluído o marcador molecular Ladder 100 pb. Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação U.V. (320 nm) utilizando o sistema de fotografia Image Máster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

11 SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos do DNA obtidos da PCR do gene *env* foram extraídos do gel e purificados utilizando o Kit de purificação de DNA, Gel Band Purification kit (AmershanBiosciences Inc.), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida o

produto foi quantificado em gel de agarose comparativamente com o marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder- Invitrogen). A reação de PCR para futuro sequenciamento foi realizada no termociclador (Bio-Rad DNA Engine®, Peltier Thermal Cycler, EUA) com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 96°C por 1 minuto seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação era realizada a precipitação do DNA por etanol. O sequenciamento dos produtos de amplificação foi realizado em ambas as direções com os primers utilizados na PCR, gene *env*, em um seqüenciador automático modelo ABI Prism® 377 DNA Sequencers (Amersham Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as seqüências foram analisadas pelo programa Phred (EWING; GREEN, 1998) e, quando necessário, repetidas.

12 ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As seqüências obtidas do gene *env* foram comparadas com as seqüências depositadas em bancos de genomas, quanto ao grau de homologia (GenBank: ncbi.nlm.nih.gov/). As seqüências obtidas foram cuidadosamente avaliadas para verificação de picos duais e para confirmação das bases que diferirão de uma seqüência consensual previamente construída. Foi utilizado o programas Bioedit Sequence Alignment Editor versão 5.0.9 para edição e tradução das seqüências de nt à seqüência de aa. Os alinhamentos foram construídos utilizando-se o programa Clustal X e alterando os parâmetros relativos à inserção de *indels* (peso de inserção = 1, extensão = 1) e manualmente ajustados.

A seqüência consenso foi utilizada para verificar o número de substituições de nt e aa nas seqüências brasileiras. O programa *on line* SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT>) foi utilizado para avaliar se as trocas de aminoácidos podiam alterar a função das proteínas codificadas pelo gene *env* do FIV.

Das 4 árvores filogenéticas construídas 3 o foram pelo método *Neighbour-joining* com Kimura 2 parâmetros – suporte de *bootstrap* com 1000 interações, em todo o trabalho.

A outra árvore, apêndice H, para uma melhor investigação no estudo prospectivo das mutações gênicas, foi inferida pelo método máxima parcimônia, MP. A árvore de MP foi construída utilizando o programa PAUP* v.4.0b10 via busca heurística – suporte de bootstrap com 1000 interações.

13 ISOLAMENTO DO VÍRUS

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas, pelo método Ficoll Hypaque® (Pharmacia Biotech), das amostras de sangue heparinizadas coletadas dos animais positivos para a imunodeficiência felina, pelo ELISA e confirmadas pela PCR (HOHDATSU et al., 1998). Para o isolamento, 10^6 células mononucleares do sangue periférico, PBMC, foram cocultivadas com 10^6 células MYA-1, células altamente sensíveis à replicação do FIV (MIYAZAWA et al., 1989). As culturas foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco Biocult, Paisley, Reino Unido) contendo 10% de soro fetal bovino (Biological Industries Ltda., Cumbernauld, Reino Unido), 2mM L-glutamina, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 100 IU de penicilina por ML e 100 µg de estreptomicina por ML. O meio foi suplementado com 5% de sobrenadante do cultivo de Ltk – IL-2.23, linhagem celular que produz interleucina 2 humana recombinante. Amostras do sobrenadante desta cultura foram testadas para a presença da proteína 24 (p24) do FIV pelo ELISA, IDEXX Laboratories, Portland, Maine.

14 CLONAGEM

Os genes completos que codificam o envelope viral do FIV, glicoproteínas de superfície (SU), V1-V6, e transmembranares (TM), V7-V9 (PANCINO et al., 1993), foram clonados e posteriormente sequenciados. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o objetivo de amplificar uma região que cobre todo o gene do envelope viral do FIV - do códon iniciador ao códon de parada. Esses *primers* foram desenhados baseados em sequências conservadas de diversos isolados de diferentes origens geográficas depositados no *GenBank*. O específico *primer* senso, *forward*, desenhado apresenta a sequência alvo de bases específicas para a enzima de restrição, endonucleases, Sal1 na extremidade 5' e o específico *primer* anti-senso, *reverse*, apresenta a sequência alvo de bases específicas para a enzima de restrição, endonucleases, Not1. A amplificação era realizada com uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 98°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 98°C por 10 segundos para a desnaturação, 58°C por 30 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos para extensão final. O produto da PCR, de cada reação, era purificado com o Kit

QIAquick spin® - QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN®), seguindo o protocolo do fabricante. Este DNA purificado era submetido à digestão com as enzimas de restrição específicas e novamente purificado. Após a quantificação do produto, realizada por espectrofotometria, a 260 nm de comprimento de onda, procedia-se a inserção em um vetor de clonagem, VR 1012 (APÊNDICE I). Os *primers* utilizados foram:

Primer senso, VIF - senso:

Sal1

5' GCGTCGACAACATGGCAGAAGGAGGGTTACTCAA 3'

Primer anti-senso, LTR – anti-senso:

Not1

5' GGGCGGCCGCCATCATTCCCTCTTTTCAGATAT 3'.

O vetor de clonagem foi utilizado para transformar células competentes que eram plaqueadas em meio seletivo contendo 50µg/mL de kanamicina. Os clones foram selecionados pela PCR das colônias utilizando os iniciadores do vetor. Todos os clones foram seqüenciados em uma fase seguinte. Os envelopes clonados foram então utilizados para transfecção das células resultando na expressão das proteínas do envelope que possibilitaram os estudos dos receptores virais. Representação esquemática do genoma proviral do FIV e localização dos *primers* utilizados são demonstrados na apêndice J.

15 PRODUÇÃO DO PSEUDOTIPO VIRAL

Para preparar o pseudotipo viral – HIV (FIV) - $3,3 \times 10^5$ células HEK-293T foram transfetadas com 5µg VR1012 (expressando os envelopes dos clones das amostras do estudo) e 5µg de um provírus do HIV (apresentando uma deleção no gene do envelope e incorporado com um gene *reporter*, luciferase) usando o reagente Superfect®, de acordo com as recomendações do fabricante (WILLETT et al., 2006). Os sobrenadantes das culturas

foram colhidos e filtrados, a $0,45\mu\text{m}$, após 72 horas de transfeccão. Estas amostras foram conservadas a -80°C para futuros estudos com os receptores do vírus.

16 ENSAIOS COM DIFERENTES RECEPTORES CD134

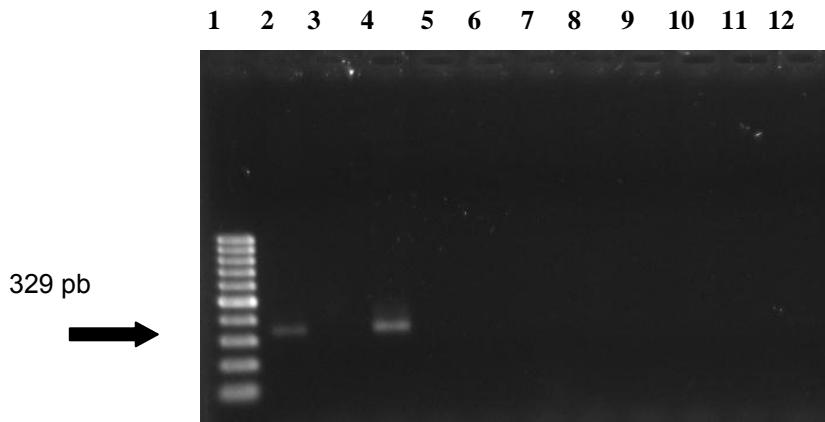
Estes ensaios foram realizados com células MCC, linhagens de células de um linfoma granular felino refratárias às infecções primárias de cepas do FIV, transduzidas com três receptores CD134 - o felino, o humano e uma quimera felino-humana F(F/H)H (APÊNDICE K) (WILLETT et al., 2006). Em placas de 96 orifícios, 1×10^4 células, de cada tipo celular citado, foram depositadas em cada *well* e cultivados overnight a 37°C . As células então foram infectadas com $50 \mu\text{l}$ dos pseudotipos HIV(FIV) e cultivadas por 72 horas quando era realizado a adição de $50 \mu\text{l}$ de substrato da enzima, Steadylite HTS (Perkin-Elmer[®]), para a mensuração da atividade da luciferase pelo aparelho MicroBeta luminometer (Perkin-Elmer[®]). A razão entre os valores encontrados da atividade da luciferase nas células com os receptores felinos e as quimeras infectadas com as amostras do estudo foi calculada para uma melhor definição da utilização desses receptores.

17 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO FIV

O estudo da variabilidade genética do FIV foi feito com base no sequenciamento do produto amplificado do gene *env* durante todo o estudo (APÊNDICE L). As seqüências obtidas no estudo foram comparadas entre si e em diferentes momentos. Essas análises permitiram a avaliação das variações genéticas de um mesmo subtipo entre os diferentes indivíduos e a realização de um estudo prospectivo das mutações gênicas num mesmo felino. Todas as seqüências foram comparadas com as depositadas em bancos de genomas quanto ao grau de homologia (Gen Bank: ncbi.nlm.nih.gov/).

REFERÊNCIAS

- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, Mar, 1998.
- HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, Jan, 1998.
- JUNQUEIRA-JORGE, J. Estudo dos fatores de risco da leucemia viral felina no município de São Paulo. **Dissertação**. Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- MIYAZAWA, T.; FURUYA, T.; ITAGAKI, S.; TOHYA, Y.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, v. 108, n. 1-2, p. 131-135, 1989.
- PANCINO, G.; FOSSATI, I.; CHAPPEY, C.; CASTELOT, S.; HURTREL, B.; MORAILLON, A.; KLATZMANN, D.; SONIGO, P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, v. 192, n. 2, p. 659-662, Feb, 1993.
- TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, Aug, 2007.
- WILLETT, B. J.; MCMONAGLE, E. L.; BONCI, F.; PISTELLO, M.; HOSIE, M. J. Mapping the domains of CD134 as a functional receptor for feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7744-7747, Aug, 2006.

APÊNDICE C –

Resultados obtidos da amplificação por “Neste PCR”, gene *gag*, analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE e corado pelo brometo de etídeo. Canaleta 1 – padrão de tamanho molecular - Ladder 100 pb; canaleta 2 – controle positivo do vírus da imunodeficiência felina; canaleta 3 – controle negativo para o vírus em estudo; canaleta 4 – amostra positiva; canaletas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 – amostras negativas; canaleta 12 – controle de reagentes. A posição da banda de 329 pb é demonstrada pela seta.

APÊNDICE D – Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos do gene *gag* e sua localização no genoma do FIV.

Primer* ¹	Seqüência (5'- 3')	Localização (nt)* ²
FIV PCR-S (+)	ACTTCTTGGCAGGCCCTCAG	1014-1034
FIV PCR-A (-)	AAGGACCTCCACAGGCTTATCC	1649-1671
FIV NESTED-S (+)	CTGCTTGTGTTCTTGAGTT	1036-1055
FIV NESTED-A (-)	TATTCAAACAGTAAATGGAG	1344-1364

*1: (+) Senso; (-) Anti-senso.

*2: Os números correspondentes àqueles da seqüência do subtipo A Petaluma (Genbank acesso no. M25381)

APÊNDICE E – Seqüência dos oligonucleotídeos que foram utilizados na amplificação de fragmentos do gene *env* e sua localização no genoma do FIV.

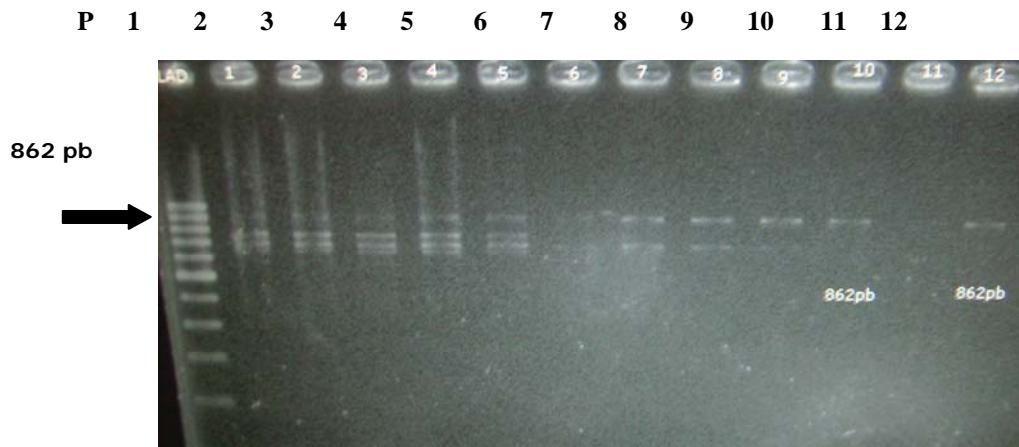
Primer*1	Sequência (5'- 3')	Localização (nt)*2
FIV ENV 1 – S (+)	CAAAATGTGGRTGGTGG A Y	7320-7340
FIV ENV 1 – A (-)	ACCATYCCWATDGCDGTRGC	8162-8182

*1: (+) Senso; (-) Anti-senso.

*2: Os números correspondentes àqueles da seqüência do subtipo A Petaluma (Genbank acesso no. M25381)

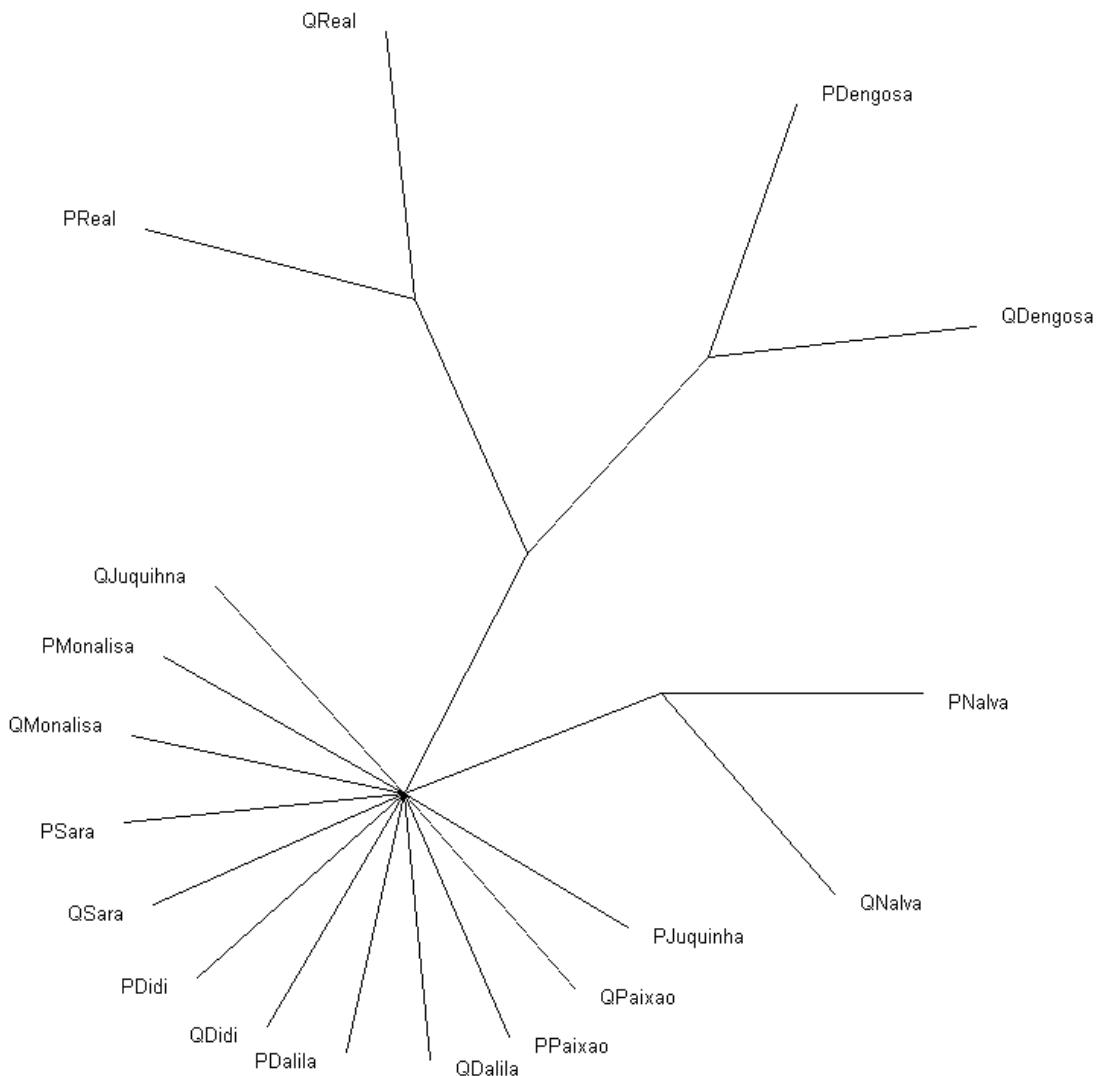
APÊNDICE F – Localização e número de aminoácidos dos genes do FIV

ORF	Coordenadas no genoma	Nº de aminoácidos
<i>Gag</i>	628-1978	450
<i>Pol</i>	1869-5241	1124
<i>Env</i>	6266-8834	856
V3	7346-7526	60
V4	7586-7766	60
V5	7856-7991	45
V6	8006-8126	40
V7	8396-8456	20
V8	8546-8636	30
V9	8756-8834	26

APÊNDICE G –

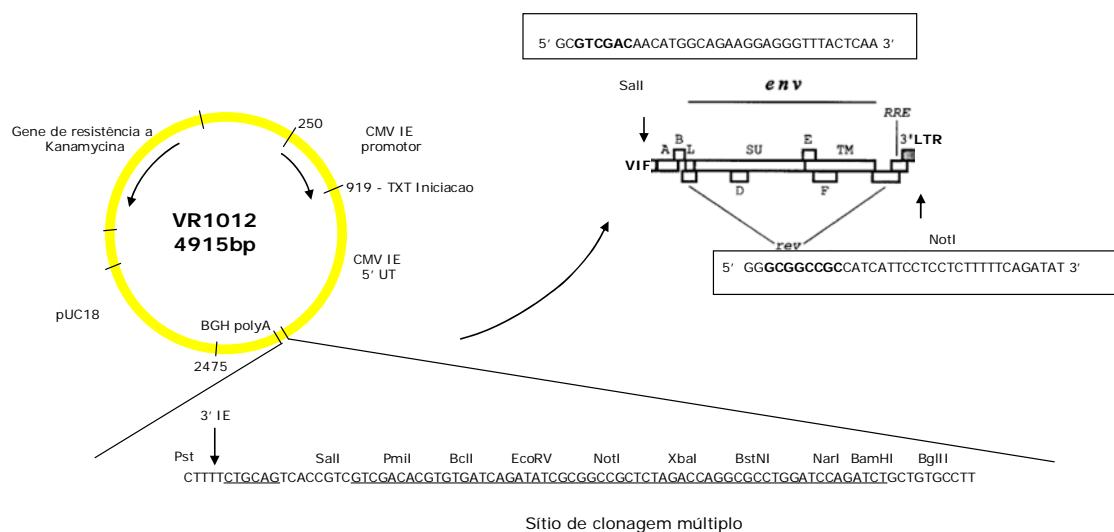
Resultados obtidos da amplificação da PCR, , gene *env*, de um animal sabidamente positivo para o FIV, com diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores e analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE, corado pelo brometo de etídeo. Primeira canaleta – padrão de tamanho molecular - Ladder 100 pb; canaleta 1 – temperatura de anelamento de 42°C; canaleta 2 – temperatura de anelamento de 44,6°C; canaletas 3 – temperatura de anelamento de 46,2°C; canaleta 4 – temperatura de anelamento de 48,1°C; canaleta 5 – temperatura de anelamento de 50,8°C; canaleta 6 – temperatura de anelamento de 52°C; canaleta 7 – temperatura de anelamento de 54,6°C; canaleta 8 – temperatura de anelamento de 56,2°C; canaleta 9 – temperatura de anelamento de 58,1°C; canaleta 10 – temperatura de anelamento de 60,8°C; canaleta 11 – temperatura de anelamento de 62°C; canaleta 12 – temperatura de anelamento de 64,6°C; canaleta 13 controle de reagentes. A posição da banda de 862 pb é demonstrada pela seta.

APÊNDICE H –

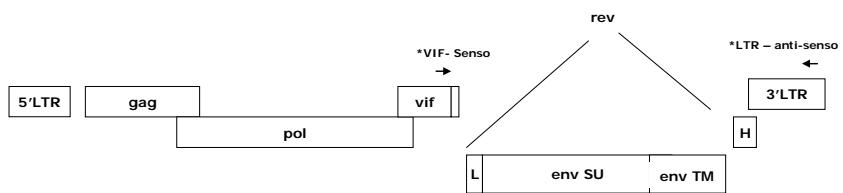


Árvore Filogenética de seqüências de 563 pb da região V4-V6 do gene *env* do vírus da imunodeficiência felina obtidas de duas coletas distintas dos felinos do estudo - Acompanhamento da variabilidade genética do vírus intrahospedeiro - Análises filogenéticas foram inferidas pelo método máxima parcimônia. A árvore foi construída utilizando o programa PAUP* v. 4.0b10 via busca heurística. As análises de suporte por *bootstrap* foram feitas em 1000 replicatas. (P) primeira coleta. (Q) quarta coleta.

APÊNDICE I – Mapa do vetor de clonagem VR1012.

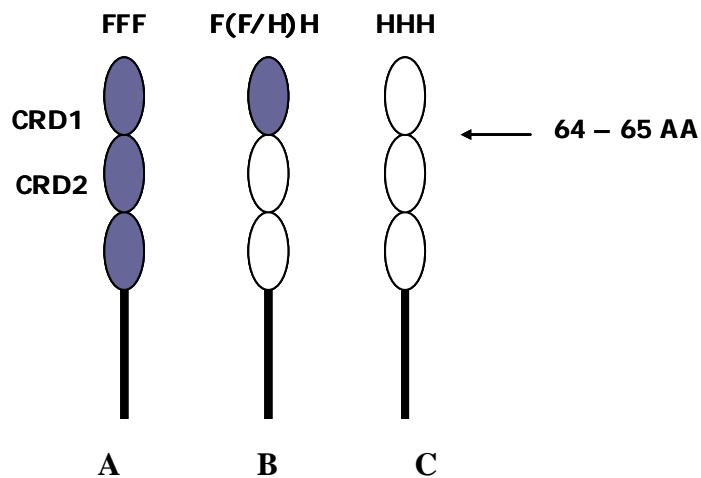


APÊNDICE J – Representação esquemática do genoma proviral do FIV e a localização dos primers utilizados na clonagem do gene *env*.



* Primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *env*.

APÊNDICE K – Estrutura esquemática dos receptores CD134. (A) felino. (B) quimera felino x humano. (C) humano. Os domínios ricos em cisteína, CRD, 1 e 2 são apresentados. A seta indica os aminoácidos entre os domínios.



APÊNDICE L – Regiões analisadas no envelope viral do FIV. (A) Domínios conservados e variados das proteínas do envelope do FIV. Os perfis analisados são baseados nos números de substituições de aminoácidos. (B) Regiões conservadas no envelope viral estão em branco na barra, as variáveis em preto e as hipervariáveis em cinza. (C) Região genômica monitorada, com relação a sua variabilidade, durante um ano de infecção pelo FIV. (D) Região clonada do vírus. (E) Modelo esquemático estrutural do envelope viral. Região monitorada no estudo apresenta-se na parte interna do retângulo.

