

Valéria Maria Lara

Estudo epidemiológico e genético do *vírus da imunodeficiência felina* identificados no estado de São Paulo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Área: Clínica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Botucatu
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Lara, Valéria Maria.

Estudo epidemiológico e genético dos *vírus da imunodeficiência felina* identificados no estado de São Paulo / Valéria Maria Lara. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Assunto CAPES: 50502018

1. Epidemiologia veterinária 2. Virologia veterinária

CDD 636.089449

CDD 636.0896014

Palavras-chave: Felinos; FIV; Filogenia; Imunodeficiência; Sorotipagem

“O amor é uma luz que não deixa escurecer a vida, é refletida do astro eterno, irradia-se de Deus. Ninguém é pobre quando ama”.

Camilo Castelo Branco

Dedicatória

Aos três homens da minha vida:

Adriano, Victor e Pedro Henrique.

*Tenho certeza absoluta que não sou
pobre!*

Amo muito vocês!

*“Um bom líder faz com que homens
comuns façam coisas incomuns”.*

Peter Drucker

Agradecimentos Especiais

*A João Pessoa, o orientador, pelo
ímpeto, pela perspicácia e por
acreditar na minha idéia quando eu
mesma duvidava.*

Muito obrigada!

*À Sueli Akemi Taniwaki, a
oriental, que com seu jeito realizou
metade do meu sonho.*

Muito obrigada!

Foi muito bom trabalhar com vocês!

“Não há dever mais urgente do que o de agradecer”

Santo Ambrósio

Agradecimentos

Agradecimentos

À minha família por todo o apoio tão importante para a minha formação.

À divina providência.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Magalhães Lopes que abriu as portas para o doutorado e assim deu-se o início de tudo.

Ao Prof. Dr. João Candeias pela valiosa e indispensável ajuda.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira pela ajuda indispensável e fundamental na análise filogenética.

Ao Prof. Dr. Paulo Ribolla por parar suas análises para fotografar os géis com sua poderosa máquina.

A Prof.a. Dra. Teresa Cristina G. O. Sequeira por disponibilizar seu laboratório de PCR, pelas conversas animadas e produtivas e por outros ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Maurício Sforcin em primeiro lugar pela amizade, pelo incentivo, por ter aberto as portas da imunologia e tantas outras coisas impossíveis de descrever.

À Sônia e Nice pelos inúmeros favores, pela constante simpatia e muito mais.

A todos os proprietários de gatis, aos médicos veterinários autônomos como o Carlos e Débora (Bauru), Eliane (Rio Preto), Fábio (São Paulo), Rita Colichio e também aos residentes das áreas de Clínica e Cirurgia de pequenos animais da FMVZ/Botucatu que permitiram a colheita de material ou coletaram por conta própria, pois sem esta ajuda seria quase impossível realizar este trabalho.

Ao Lula, funcionário do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que prestou uma valiosa ajuda no período de colheita do material.

Ao Daniel, vulgo Tank, e a Aline pela indispensável e importante ajuda durante o seqüenciamento genético e mais ainda pela enorme simpatia. Minha sincera e eterna gratidão!

A todos os amigos, principalmente, Patrícia, Neca, Carla, Cristina, Raquel, Sandra, Keila, Roueda, Tânia, Karina, Alir e Katinha pelas conversas e reflexões, que tanto escutaram minhas questões, queixas e desabafos. Muito obrigada! E para vocês

Agradecimentos

deixo a seguinte mensagem: “Só existe uma coisa melhor do que fazer novos amigos: conservar os velhos”. (Elmer G. Lettermann).

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, laboratório de Virologia e Pós-Graduação: Thiago, Camilo, Márcia Guimarães, Cilmary, Márcia (Parasitologia) e Patrizia.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu-SP.

A todas as pessoas que direta e indiretamente auxiliaram neste trabalho.

À Denise, funcionária da pós-graduação, pelas inúmeras informações e favores prestados.

A Capes (Bolsa) e Fapesp (Auxílio à Pesquisa Processo 02/02649-0) pela ajuda financeira.

Às bibliotecárias Luciana e Selma Maria pela ajuda indispensável na confecção da tese.

Aos queridos gatos e gatitos que mesmo sem saber prestaram um enorme auxílio na minha carreira acadêmica e científica.

Lista de figuras

- Figura 1-** Representação esquemática do *vírus da imunodeficiência felina* com a indicação de estruturas e das proteínas codificadas pelos genes gag e env.....19
- Figura 2-** Ciclo de replicação de um retrovírus.....23
- Figura 3-** Distribuição da região geográfica do estado de São Paulo onde foram colhidas as amostras de sangue total dos 519 gatos domésticos selecionados para o diagnóstico da imunodeficiência felina.....38
- Figura 4** Representação esquemática do genoma do vírus da imunodeficiência felina com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR. Genes estruturais, *gag-pol-env* (proteínas do envelope, SU=superfície, TM=transmembrana) e genes suplementares *vif - orf 2 - rev*. Proteínas codificadas pelo gene *gag*, MA=Matriz, CA= Capsídeo e NC= Nucleocapsídeo. FIV PCR-S2 e FIV PCR-A2= “primers” externos (primeira PCR); FIV NESTED-S e FIV NESTED-A= “primers” internos (segunda PCR).....42
- Figura 5-** Distribuição geográfica dos gatos domésticos positivos à infecção pelo *vírus da imunodeficiência felina* de acordo com a cidade de origem do estado de São Paulo, Brasil.....49
- Figura 6.** Resultado da amplificação de DNA do *vírus da imunodeficiência felina* pela reação da PCR e PCR-Nested utilizando os primers FIV-PCR A2 e FIV- PCR S2, e FIV-NESTED A e FIV-NESTED S A. Colunas 1, 2 e 3: são observadas bandas positivas da reação de PCR; Coluna 4: Padrão de Peso Molecular 123 pb (Gibco, BRL[®]); Colunas 5, 6 e 7: bandas positivas da reação do PCR-Nested.....53
- Figura 7-** Resultado da purificação dos fragmentos amplificados pela PCR e extraídos do gel de agarose a 1% utilizando o “Kit” comercial GFX PCR DNA and gel Band Purification. PM= padrão de peso molecular 50pb (Gibco, BRL[®]); 1= BT-02 e 2= SP-05. BT= Botucatu; SP= São Paulo.....54
- Figura 8-** Visualização do gel de agarose 1,5% utilizado para a quantificação dos fragmentos de DNA do *vírus da imunodeficiência felina*. PM = Low DNA mass ladder[®] (Life Technologies), bandas de 10, 20, 40, 80, 120 e 200ng de DNA; 1= BT-02; 2= SP-05; 3= SP-165; 4= BT-395; 5= BT-402; 6= BT-406; 7= BT-408; 8= SZ-418; 9= SP-419; 10= SP-420;

11= PM; 12= SP-421; 13= JA-261; 14= JA-263; 15= BT-271; 16= JÁ-264; 17= BT-105; 18= BR-485; 19= BT-507; 20= 515. BT= Botucatu; SP= São Paulo; SZ= Suzano; JÁ= Jaú; BR= Bauru.....55

Figura 9 Representação esquemática do genoma do *vírus da imunodeficiência felina* com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR. Genes estruturais, *gag-pol-env* (proteínas do envelope, SU=superfície, TM=transmembrana) e genes suplementares *vif* - *orf 2* – *rev*. Proteínas codificadas pelo gene *gag*, MA=Matriz,, CA= Capsídeo e NC= Nucleocapsídeo. FIV PCR-S2 e FIV PCR-A2= “primers” utilizados na reação da PCR-fragmento obtido de 658pb. Sequência obtida na análise genética- 459pb.....56

Figura 10- Sequências de nucleotídeos do gene *gag* do *vírus da imunodeficiência felina* dos 32 isolados neste trabalho e dos publicados anteriormente no GenBank, alinhadas com o auxílio do ClustalX. Para facilitar a visualização das diferenças, posições conservadas entre a primeira sequência e as demais foram substituídas por pontos.....57

Figura 11- Sequências de aminoácidos do gene *gag* do *vírus da imunodeficiência felina* dos 32 isolados neste trabalho e dos publicados anteriormente no GenBank, alinhadas com o auxílio do ClustalX. Para facilitar a visualização das diferenças, posições conservadas entre a primeira sequência e as demais foram substituídas por pontos.....63

Figura 12- Árvore consenso construída pelo método de agrupamento de vizinhos obtida através das 32 amostras dos *vírus da imunodeficiência felina* estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26. Os números nos nós indicam o suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas.....68

Figura 13- Árvore consenso construída pelo método de agrupamento de vizinhos obtida através das 32 amostras dos *vírus da imunodeficiência felina* estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26.....69

Figura 14- Árvore filogenética construída pelo método de evolução mínima obtida através das 32 amostras dos *vírus da imunodeficiência felina* estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26. Os números nos nós indicam o suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas.....70

Figura 15- Árvore filogenética construída pelo método de evolução mínima obtida através das 32 amostras dos *vírus da imunodeficiência felina* estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26.....71

Figura 16- Árvore filogenética construída pelo método da máxima parcimônia obtida através das seqüências de nucleotídeos do gene *gag* dos *vírus da imunodeficiência felina*, com os índices de *bootstrap*. As chaves de cor azul representam os subclades do genótipo B.....72

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1- Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar um fragmento de 329pb do gene *gag* do *vírus da imunodeficiência felina*, segundo Hohdatsu et al. (1998).....41

Quadro 2- Distribuição das 81 amostras positivas para os *vírus da imunodeficiência felina*, de acordo com suas características de origem, sexo e sinais clínicos.....51

Tabela 1- Distribuição do número total de gatos domésticos selecionados para o diagnóstico dos *vírus da imunodeficiência felina* de acordo com a forma clínica e o sexo.....39

Tabela 2- Percentagem de animais positivos e negativos para o *vírus da imunodeficiência felina*, classificados de acordo com o estado clínico e sexo.....50

Tabela 3- Matriz de distâncias não corrigidas entre as seqüências de nucleotídeos das 32 amostras estudadas dos *vírus da imunodeficiência felina* e a amostra de referência do genótipo A.....74

Tabela 4 Matriz de distâncias entre as seqüências de aminoácidos das 32 amostras estudadas dos *vírus da imunodeficiência felina* e a amostra de referência do genótipo A.....74

LARA, V. M. **Estudo epidemiológico e genético dos vírus da imunodeficiência felina identificados no estado de São Paulo.** Botucatu, 2004. 94 P Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

O presente trabalho objetivou determinar a frequência do *vírus da imunodeficiência felina*, correlacioná-la a dados epidemiológicos, identificar os diferentes sorotipos das amostras positivas e realizar a análise filogenética das mesmas. Para tanto, foram colhidas 519 amostras de sangue total de gatos domésticos oriundos de diferentes cidades do estado de São Paulo submetidas à técnica de PCR-nested para identificação do vírus. Dessas amostras, 81 (15,6%) apresentaram-se positivas ao teste, das quais 45 (55,5%) pertenciam a gatos com sinais clínicos de alguma enfermidade, sendo 21 fêmeas e 24 machos. Vinte e duas amostras (27,2%) foram provenientes de animais aparentemente normais, com duas fêmeas e 20 machos, e outras 14 (17,3%) a gatos sem histórico clínico definido, com três fêmeas e 11 machos. Foram submetidas ao sequenciamento genético 50 (61,7%) amostras positivas. Entretanto, em somente 32 destas (64%) realizou-se a inferência filogenética. A análise genética foi baseada em um segmento do gene gag de 459 pb. As relações genealógicas foram realizadas através dos métodos da máxima parcimônia, da evolução mínima e de agrupamento de vizinhos. Os resultados obtidos revelaram uma ampla similaridade entre as três árvores construídas e em todas elas, as 32 amostras estudadas foram agrupadas dentro do mesmo sorotipo, que foi o sorotipo B.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência felina; FIV; filogenia; sorotipagem; sequenciamento genético; gatos.

LARA, V. M. **Epidemiologic and genetic study of feline immunodeficiency virus identified in São Paulo state.** Botucatu, 2004. 94P Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

The present work aimed to determine the feline immunodeficiency virus frequency, to correlate it to epidemiologic data, to identify different FIV subtypes of positive samples and also to accomplish its phylogenetic analysis. For that, it was collected 519 blood samples of domestic cats from different cities of the São Paulo state, submitting them by PCR-nested for virus identification. Eighty one samples (15.6%) were positive to the test, which 45 (55.5%) of them were from animals with clinical signs of some illness. Those samples, 21 were from female and 24 from male cats. Twenty-two of the positive samples (27.2%) were from healthy cats (2 females and 20 males), and 14 of them (17.3%) from cats without clinical history (3 females and 11 males). Fifty positive samples (61.7%) were submitted to DNA sequencing, but only in 32 of them the phylogenetic inference was done. The genetic analysis was based on a segment of the gag gene with 459pb. The genealogical relationships were established through maximum parsimony, minimum evolution and neighbor-joining methods. The results revealed a wide similarity among the three built trees and, in all of them, the 32 studied samples were allocated inside of the same subtype, that was the subtype B.

Word-keys: feline immunodeficiency virus; FIV; phylogeny; DNA sequencing, cats.

Sumário



Sumário

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1- Introdução.....	18
1.1- <i>Vírus da imunodeficiência felina</i>	18
1.2- Considerações gerais sobre análise filogenética.....	30
2- Objetivo.....	35
3- Material e Métodos.....	37
3.1- Delineamento experimental.....	37
3.2- Animais.....	37
3.3- Amostras.....	39
3.4- Teste de viabilidade das amostras.....	39
3.5- Extração do DNA das amostras.....	40
3.6- PCR-Nested.....	40
3.6.1-Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”).....	40
3.6.2- Amplificação do DNA viral.....	43
3.7- Sequenciamento Genético.....	44
3.7.1- Amostras positivas.....	44
3.7.2- Purificação do Fragmento Amplificado do Gel de Agarose.....	44
3.7.3- Quantificação dos fragmentos de DNA.....	45
3.7.4- Reação de Sequenciamento.....	45
3.8- Alinhamento das Sequências do Gene Gag do Vírus da imunodeficiência felina.....	46
3.9- Análise Filogenética.....	46
4- Análise Estatística.....	47
4- Resultados.....	49
4.1- Animais positivos.....	49
4.2- Teste de viabilidade das amostras.....	53

4.3- Amplificação do DNA das amostras do Vírus da Imunodeficiência pela PCR-nested.....	53
4.4- Purificação do Fragmento Amplificado.....	54
4.5- Quantificação do fragmento amplificado pelo PCR.....	54
4.6- Reação de Sequenciamento.....	55
4.7- Alinhamento das seqüências do gene gag do <i>vírus da imunodeficiência felina</i>	57
4.8- Análise Genealógica.....	66
4.8.1- Determinação do modelo de substituição nucleotídica.....	66
4.8.2- Construção das árvores filogenéticas.....	66
4.9 – Mutações.....	73
5- Discussão.....	76
6- Conclusões.....	83
7- Referências Bibliográficas.....	85

*“Às vezes ouço o passar do vento, e, só de ouvir
o vento passar, vale a pena ter nascido”*

Fernando Pessoa

Introdução

1 Introdução

1.1- Vírus da imunodeficiência felina

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi isolado pela primeira vez em gatos domésticos (*Felis catus*) pertencentes a um criatório no norte da Califórnia, E.U.A., em 1986 (PEDERSEN et al., 1987). Esse novo patógeno recebeu inicialmente a designação de vírus linfotrópico-T felino (VLTF), mediante seu isolamento em linfócitos do sangue periférico de gatos infectados e pelo seu tropismo *in vitro* por estas células (SPARGER, 1993). Posteriormente, Yamamoto et al. (1988b) renomearam-o FIV após demonstrarem, em estudos clínicos, a associação entre a infecção por este vírus e distúrbios imunológicas em gatos domésticos.

O FIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, na qual estão também alocados os vírus da imunodeficiência humana (HIV) e dos símios (SIV), relacionados geneticamente e morfológicamente (VAN REGENMORTEL et al., 2000). O vírion completo mede 105-125 nm de diâmetro; possui forma esférica a elipsóide e um envelope que contém peplômeros não muito bem definidos, circundando um nucleocapsídeo icosaédrico (Figura 1) (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Seu ácido nucléico é constituído por duas moléculas de RNA não complementares, idênticas, de polaridade positiva, com 9,4 kilobases. Apresenta organização genômica complexa, possuindo, além dos genes que codificam proteínas estruturais *Gag*, *Pol* e *Env*, vários outros adicionais que codificam proteínas não estruturais (KUBY, 1997). Nas extremidades 5' e 3' do genoma, encontram-se regiões repetidas

denominadas de “*Long Terminal Repeats*” (LTRs), que contém as informações para a iniciação e terminação da transcrição (MAKI et al., 1992).

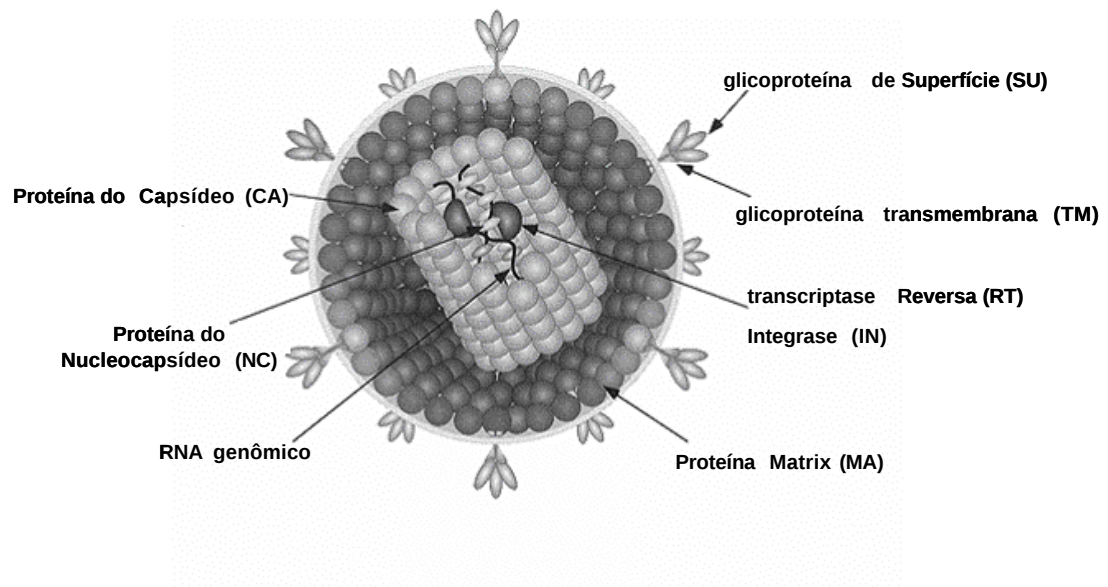


Figura 1- Representação esquemática do vírus da imunodeficiência felina com a indicação de estruturas e das proteínas codificadas pelos genes gag e env

O gene *env* (envelope) é responsável pela síntese de duas glicoproteínas reconhecidas como os principais antígenos responsáveis pela resposta imunológica para o FIV (PANCINO et al., 1993) e, desta maneira, os estudos da diversidade do vírus, inicialmente, foram baseados no mesmo (RIGBY et al., 1993; SODORA et al., 1994). As estirpes de FIV isoladas de gatos domésticos já foram classificadas dentro de cinco genótipos, designados em A, B, C, D e E por comparação da sequência de 684 nucleotídeos compreendidos na região entre V3 até V5 do gene

env (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; PECORARO et al., 1996). Hohdatsu et al. (1998), ao realizarem estudos filogenéticos com a estirpe Petaluma do FIV demonstraram alta correlação entre os genótipos baseados no gene *env* com os genótipos baseados na sequência de nucleotídeos da região P17-P24 do gene *gag*.

Os estudos de sorotipagem do FIV demonstram uma distribuição geográfica desigual. O genótipo A inclui as estirpes de FIV isoladas na Califórnia, Austrália e Europa (GREENE et al., 1993; RIGBY et al., 1993; SODORA et al., 1994; BACHMANN et al., 1997; PISTELLO et al., 1997); o genótipo B as estirpes isoladas no Japão e na região central e leste dos E.U.A. e Europa (KAKINUMA et al., 1995; BACHMANN et al., 1997; PISTELLO et al., 1997; DUARTE et al., 2002; STEINRIGL & KLEIN, 2003); o genótipo C inclui as estirpes isoladas no Canadá, Europa e Formosa (SODORA et al., 1994; KAKINUMA et al., 1995; INADA et al., 1997); o genótipo D foi, até o presente momento, somente identificado no Japão (KAKINUMA et al., 1995) e o genótipo E identificado na Argentina e Japão (SODORA et al., 1994; PECORARO et al., 1996).

Duarte et al. (2002), identificaram através da análise da sequência de nucleotídeos da LTR (Long Terminal Repeat), da região codificadora da proteína do capsídeo (CA) do gene *gag* e também da região V3-V5 do gene *env*, a ocorrência do genótipo B em cinco isolados de FIV oriundos de gatos portugueses. Esse trabalho retrata até o momento a existência de único genótipo em Portugal.

Steinrigl & Klein (2003), através da análise filogenética do gene *gag* e *env* de FIV, confirmaram a ocorrência do genótipo A e B em países da Europa Central.

No Brasil já foi constatada a presença de infecção pelo FIV (HAGIWARA et al., 1993; RECHE JUNIOR et al., 1997; CALDAS et al., 2000) e até o momento, a única sorotipagem realizada foi no estado de Minas Gerais observando-se a ocorrência do genótipo B

em nove amostras de FIV identificadas por “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) (CAXITO et al., 2003).

O FIV tem sido identificado em todos os países onde se pesquisou a sua presença. A situação epidemiologia mundial mostra uma ampla difusão desse vírus, com taxas de soroprevalência variando em torno de 1% a 52,7% (FRIEND et al., 1990; FURUYA et al., 1990; MORAILLON, 1990; BANDECCHI et al., 1992; BRALEY, 1994). Gentile et al. (1996), em Bolonha (Itália), demonstraram 15% de positividade em animais clinicamente suspeitos. Porém, a taxa de soroprevalência observada em animais assintomáticos nesse país é de 6% (BOARI et al., 1992). Segundo Hartmann (1998), as diferenças observadas nas taxas de soroprevalência estão diretamente relacionadas com o estado fisiológico dos gatos investigados.

Estudos retrospectivos utilizando amostras de soro de gatos armazenadas a partir de 1968, nos E.U.A. e Japão, 1972 na Austrália e 1975 na Europa, demonstraram anticorpos contra o FIV, indicando a presença do mesmo há muito tempo na população de felinos domésticos (GRUFFYDD-JONES et al., 1988; SABINE et al., 1988; SHELTON et al., 1989; FURUYA et al., 1990).

As investigações epidemiológicas mostram que os gatos machos de vida-livre apresentam maior risco de infectar-se (GRINDEM et al., 1989; PERI et al., 1994; GENTILE et al., 1996). A porcentagem de gatos infectados é três vezes superior nos machos em relação às fêmeas e a maior incidência de infecção é observada nos animais com idade entre 5 e 10 anos (YAMAMOTO et al., 1988a; PERSECHINO et al., 1989).

Um importante método de transmissão natural do FIV ocorre pela inoculação de saliva contaminada através das mordeduras sofridas durante as brigas pela defesa do território, pela alimentação e pelas fêmeas, comportamento principalmente observado nos machos (DARDS, 1983; KERBY & MACDONALD, 1988; LIBERG & SANDELL, 1988; BRADSHAW

& HALL, 1999), justificando assim a maior incidência observada neste sexo (PEDERSEN et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989). Os gatos portadores assintomáticos possuem vírus na saliva podendo também transmitir a infecção (AYALA et al., 1998).

A transmissão vertical já foi demonstrada em diversos lentivírus da família dos retrovírus como o *vírus da imunodeficiência humana* (EHRNST et al., 1991). Os primeiros estudos sobre o FIV não confirmaram esse fato (YAMAMOTO et al., 1988a). Contudo, Callanan et al. (1991), Wasmoen et al. (1992), Sellon et al. (1994) e O'Neil et al. (1996) indicaram a possibilidade de transmissão uterina, durante o parto e através do leite das fêmeas com infecção crônica.

Em estudos experimentais a infecção pode ocorrer não somente por via vaginal, mas também por via retal (MOENCH et al., 1993; JORDAN et al., 1995). Jordan et al. (1996) demonstraram a possibilidade de transmissão do FIV através da inseminação artificial, porém, neste experimento, a infecção só ocorreu quando se utilizou sêmen fresco. Na infecção natural ou experimental, o FIV tem sido isolado de sangue, soro, plasma, fluido cerebrospinal e saliva (YAMAMOTO et al., 1988a; DOW et al., 1990) sugerindo outras possíveis formas de transmissão.

A replicação do FIV encontra-se esquematizada na figura 2. Após adsorção do vírion com o receptor específico na superfície de uma célula alvo por intermédio da glicoproteína de superfície, o FIV penetra na célula por fusão com a membrana plasmática e libera seu ácido nucléico no citoplasma. Por ação da transcriptase reversa viral (TR) e utilizando o RNA transportador (RNAt) como iniciador, o RNA viral é transcrito para uma fita dupla de DNA complementar que, no núcleo, será integrado ao cromossoma celular por ação de *endonuclease* viral (*integrase*), chamado de DNA pró-viral ou pró-vírus. A integração do DNA-proviral não

ocorre em um ponto específico dentro do DNA celular, podendo ocorrer em muitos locais. O restante da replicação é totalmente dependente da maquinaria sintética da célula hospedeira, produzindo assim proteínas e ácidos nucleicos virais que constituirão novas partículas infectantes. Após a liberação, ocorre uma maturação na partícula viral por meio da ação da *protease* viral (HARTMANN, 1998).

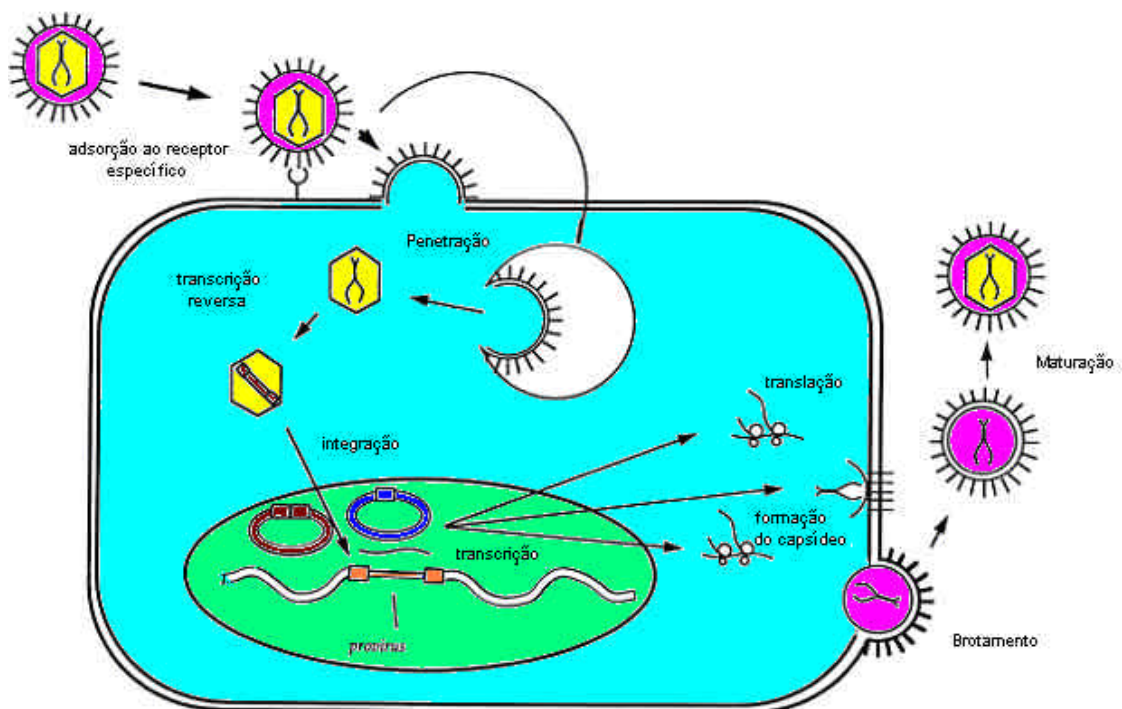


Figura 2- Ciclo de replicação de um retrovírus

Dentre os lentivírus, o FIV é o que apresenta provavelmente maior tropismo celular. Já foi isolado de linfócitos B (DEAN et al., 1996), de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (CAMPBELL & ROBINSON, 1998), de macrófagos (BRUNER & PEDERSEN, 1989; DOW et al., 1990), de astrócitos e também de células microgliais (DOW et al., 1990; DANAVE et al., 1994). Assim como o HIV e o SIV, algumas estirpes de FIV replicam-se melhor em linfócitos T e somente uma

minoria em macrófagos, enquanto outras estirpes estão aptas a replicar-se igualmente bem em ambos os tipos de células (HARTMANN, 1998). *In vitro*, algumas estirpes de FIV também crescem em células fibroblásticas de rim felino (CrFK-Crandell Feline Kidney cells) (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1989).

Pesquisas demonstraram que o CD4 é o receptor primário para os lentivírus de primatas, porém, não é o mediador para a entrada do FIV na célula-alvo (WILLET et al., 1994). Sugeriu-se que a tetraspina/CD9 poderia ser o receptor primário do FIV (HOSIE et al., 1993). Entretanto, estudos subsequentes utilizando anticorpos monoclonais anti-CD9 felino demonstraram que os mesmos impedem a liberação do vírus, mas não bloqueiam a fusão e a entrada do FIV na célula do hospedeiro (DE PARSEVAL et al., 1997). Recentemente, várias investigações demonstraram a possibilidade do FIV interagir ao co-receptor α -quimiocina CXCR4 e assim entrar na célula-alvo, independentemente do CD4⁺ (WILLET et al., 1997; HOSIE et al., 1998a; POESCHLA & LOONEY, 1998; EGBERINK et al., 1999; RICHARDSON et al., 1999; LERNER & ELDER, 2000; CANEY et al., 2002).

A patogênese da infecção pelo FIV ainda não é bem compreendida. Apesar da resposta imune, tanto humoral, como celular, o que se observa é uma infecção crônica de curso longo ou até mesmo latente (HARTMANN, 1998). As células alvo primárias da infecção são os linfócitos, mas já durante a fase aguda ocorre uma intensa infecção de macrófagos (BEEBE et al., 1994).

A quantidade de vírus inoculada está diretamente relacionada ao tempo de aparecimento da viremia e à produção de anticorpos (YAMAMOTO et al., 1988a). Os vírus podem ser isolados de linfócitos entre o décimo e décimo quarto dia pós-infecção. A viremia aumenta rapidamente até o vigésimo primeiro dia, com picos entre a sétima e oitava semana

(GEORGE et al., 1993; DUA et al., 1994). Durante esse período, as células $CD4^+$ diminuem em um terço devido à replicação viral; entretanto, um leve aumento é observado posteriormente (HARTMANN, 1998). A seguir, observa-se um longo período com lento declínio das células $CD4^+$, culminando em rápida diminuição das mesmas.

A diminuição na contagem de células T $CD4$ na infecção pelo FIV já foi reportada tanto na infecção natural como na experimental (HOFFMANN-FEZER et al., 1992). Ao mesmo tempo, observa-se uma inversão da proporção de $CD4^+ : CD8^+$ (DIEHL et al., 1995; ENGLISH & TOMKINS, 1995). A diminuição quantitativa de $CD4^+$, contudo, não pode ser somente explicada pela citólise como resultado da infecção viral, uma vez que a porcentagem de células infectadas é significativamente menor que o número de células mortas. Desse modo, a morte celular programada, ou apoptose, é apontada como uma das possíveis causas para esse fenômeno (BISHOP et al., 1993; AMEISEN, 1994; OHNO et al., 1994; CAMPBELL & ROBINSON, 1998). Além da diminuição das células $CD4^+$, os gatos infectados mostram uma disfunção da resposta imunológica assim como ocorre nos humanos infectados pelo HIV (CLERICI et al., 1989; ISHIDA et al., 1990; TORTEN et al., 1991; BISHOP, 1995).

Os gatos infectados começam a produzir anticorpos após duas semanas da infecção e no início são dirigidos contra as proteínas do envelope, e em seguida, contra as proteínas do núcleocapsídeo (DAWSON et al., 1991; EGBERINK et al., 1992; REUBEL et al., 1994; RIMMELZWAAN et al., 1994).

Com o declínio das células $CD4^+$ e da inversão da proporção de $CD4^+ : CD8^+$, ocorre uma mudança na resposta imunológica do animal, observando-se uma depressão na produção da interleucina-2 (IL-2) acompanhada por um significativo aumento na produção de IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). Assim, o FIV provoca alteração na produção das citocinas, o que também contribui para a disfunção imunológica (LAWRENCE et al., 1995). Além disso, as

células T CD8⁺ de gatos infectados pelo FIV produzem fatores antivirais supressores, assemelhando-se ao fator antiviral mediado pelo CD8 observado em pacientes HIV-positivos (FLYNN et al., 1999; CHOI et al., 2000). Segundo Bendinelli et al.(1995) e Liang et al.(2000), os gatos infectados possuem forte atividade de célula T helper com aumento de gama-interferon e da produção de IL-10 durante os estágios iniciais da enfermidade e, com a evolução da infecção, esta atividade vai diminuindo gradativamente.

Muitos esforços têm sido feitos para definir o curso clínico da infecção pelo FIV (KYAW-TANNER & ROBINSON, 1996). Dessa forma, tanto na infecção pelo FIV como pelo HIV, a primeira fase ou fase aguda da doença é bem definida (YAMAMOTO et al, 1988a; BARLOUGH et al, 1991). Esta fase é, geralmente, caracterizada por febre, diarreia, gengivite, conjuntivite, uveíte, icterícia, septicemia bacteriana secundária, neutropenia, que pode estar associada a uma leve ou moderada leucopenia, e linfadenopatia generalizada (HARTMANN, 1998).

A gravidade dos sinais clínicos da fase aguda varia com a idade do animal. Gatos recém nascidos podem desenvolver linfadenopatia persistente e agravamento da doença na adolescência. Já gatos idosos, podem apresentar sinais mínimos da enfermidade, embora progridam muito mais rapidamente para a próxima fase (GEORGE & PEDERSEN, 1991).

Após a fase aguda, os gatos entram em um longo período de aparente normalidade clínica na qual o vírus ainda pode ser isolado, caracterizando-se como uma infecção crônica. A duração desse período não é bem definida, mas acredita-se ser de cinco ou mais anos. Durante essa fase, observa-se uma diminuição das células CD4⁺ e na proporção de CD4:CD8, e uma hipergamaglobulinemia (ACKLEY et al, 1990; BARLOUGH et al, 1991).

A fase de latência é de especial interesse para todos os pesquisadores dos lentivírus. O reconhecimento imperfeito dos lentivírus pelo sistema imune permite a sua persistência no

hospedeiro fornecendo uma fonte de infecção contínua. Em alguns lentivírus, essa falha seria a explicação para a cronicidade da doença (CAMPBELL & ROBINSON, 1998). Contudo, Kyaw-Tanner et al. (1994) e Kyaw-Tanner & Robinson, (1996), sugeriram que, alternativamente, a doença possa ser modulada pela co-existência das quasipécies virais que podem produzir uma superinfecção.

Segundo Joag et al. (1996), uma outra explicação pela qual os lentivírus evadem do sistema imune está relacionada ao seu ciclo de vida. Provavelmente, todos os retrovírus formam um DNA intermediário permanecendo integrado ao DNA da célula hospedeira. As células portadoras de DNA pró-viral, sem expressar proteínas virais, permanecem indetectáveis para o sistema imune.

A terceira fase é caracterizada por sinais inespecíficos da doença e de infecções oportunistas. Os gatos infectados com 10 anos de idade ou mais, progridem para essa fase entre 6-12 meses; entretanto nos animais mais jovens como filhotes, adolescentes ou adultos jovens este período é normalmente mais longo (GEORGE & PEDERSEN, 1991). Os sinais mais comuns são febre recorrente, leucopenia, linfadenopatia, anemia, redução do apetite, perda de peso, infecções orais progressivas e crônicas, ou mudanças comportamentais não específicas. Essa fase pode durar de seis meses a alguns anos (HARTMANN, 1998).

Os gatos, na quarta fase ou AIDS propriamente dita, sofrem de infecções oportunistas virais, parasitárias, fúngicas e bacterianas em múltiplos órgãos e/ou distúrbios mieloproliferativas, tumores e sinais neurológicos. As infecções oportunistas mais observadas são a toxoplasmose sistêmica, a criptococose, a demodicose, a criptosporidiose e a calicivirose (LAPPIN, 1995).

Os sinais clínicos não são suficientes para um diagnóstico definitivo da infecção pelo FIV. A detecção viral clássica pelo cultivo celular e pelo isolamento do vírus do plasma ou dos

linfócitos sanguíneos periféricos pode ser realizada durante todas as fases clínicas da doença, mas não apresentam praticidade e nem podem ser usadas rotineiramente para o diagnóstico clínico (JARRET et al, 1991). Na atualidade, a infecção pelo FIV pode ser diagnosticada pela detecção de anticorpos circulantes, pois os gatos não se recuperam da infecção por este vírus, existindo assim uma correlação direta entre a presença de anticorpos e a infecção viral (O'CONNOR et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989). Os anticorpos podem ser detectados após quatro semanas da infecção e permanecendo por toda a vida do animal, porém, durante os estágios anteriores a este e no final da doença estão em níveis não detectáveis (PEDERSEN et al, 1989).

As provas utilizadas para detecção de anticorpos circulantes são a imunofluorescência indireta, western blotting e, principalmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), a qual está disponível em kits comerciais e que podem ser usados nas clínicas veterinárias particulares. Entretanto, os animais positivos para essa prova devem ser testados também por métodos mais específicos como Western Blotting e, recentemente, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que detecta o DNA pró-viral e não anticorpos (HARTMANN et al., 1994). Além de ser uma prova de alta sensibilidade e especificidade analítica, o DNA pró-viral pode ser detectado em linfócitos de sangue periférico após o quinto dia e em outros órgãos após o décimo dia do início da infecção (REUBEL et al., 1994).

Com o aumento da prevalência mundial da infecção pelo FIV e com a severidade da doença, é imperativo o desenvolvimento de uma vacina para o Brasil. Os estudos baseados na diversidade genética do FIV objetivam o conhecimento dos genótipos existentes em vários países, proporcionando, desta maneira, a produção de uma vacina segura e eficaz. Diversos trabalhos já foram realizados na tentativa de produzir uma vacina para o FIV, utilizando estratégias diferentes como vacina com vírus vivo modificado, vírus inativado, de subunidade

viral e vírus recombinantes (HOSIE, 1994; HOSIE et al, 1995; LUTZ et al., 1995; HOSIE & FLYNN, 1996; HOSIE et al., 1998b; LOCKRIDGE et al., 2000; BIGORNIA et al., 2001; PU et al., 2001). Porém, vacinas com um único genótipo demonstraram proteger somente contra os vírus homólogos e os ligeiramente heterólogos e falharam totalmente contra os outros (ELYAR et al., 1997). Em contraste, vacinas produzidas com dois genótipos diferentes demonstraram proteger contra um terceiro genótipo não incluso na mesma (PU et al., 2001). Com isso, em 2002, nos E.U. A., foi aprovada pelo departamento de agricultura (USDA) a vacina Fel-O-Vax FIV (Laboratório Fort Dodge) composta de dois genótipos diferentes (UHL et al., 2002). Entretanto, Steinrigl e Klein (2003), sugeriram que ainda é muito importante conhecer a distribuição geográfica dos genótipos virais de FIV para poder adaptar a vacina de acordo com a prevalência dos mesmos em cada região, visto que o desenvolvimento de uma vacina “global” talvez seja impossível.

1.2 - Considerações gerais sobre análise filogenética

Uma das grandes contribuições de Charles Darwin para a ciência foi à teoria da evolução das espécies. Segundo Darwin, as espécies evoluíam e se diversificariam através de um fenômeno de natureza populacional, a seleção natural. Entretanto, com o passar do tempo, foi demonstrado que ocorre variabilidade genética e que, nos ácidos nucleicos sua origem é a mutação. Sabe-se ainda que, além da seleção natural, no processo de deriva genética, um alelo pode ter sua frequência alterada por uma questão de amostragem aleatória entre gerações. O processo de substituição alélica, no qual um alelo é substituído por outro na evolução de uma população, combina o processo de mutação com um ou ambos os fenômenos responsáveis pela mudança das frequências alélicas, a seleção natural ou a deriva genética.

Nos primeiros modelos evolutivos criados para explicar a evolução molecular acreditava-se que as substituições alélicas ocorriam em intervalos de tempo mais ou menos regulares. A substituição nucleotídica pode dar origem a novos alelos, denominada mutação pontual. Essas mutações ocorrem quando uma base é erroneamente incorporada durante a replicação viral. As mutações podem ser classificadas em transições, quando uma purina (A ou G) é incorporada no lugar de outra purina, ou quando uma pirimidina (C ou T) é incorporada no lugar de outra pirimidina, e transversões, ou seja, mutações em que ocorre a troca de uma purina por uma pirimidina e vice-versa. Além disso, as mutações também podem ser chamadas de sinônimas e não-sinônimas quando são observadas em regiões codificadoras do genoma, resultando em mudança na proteína. Deste modo, quando a substituição nucleotídica não provoca alteração no aminoácido resultante, diz-se que a substituição é sinônima, e quando há alteração no aminoácido resultante é considerada não-sinônima (CALCAGNOTTO, 2001). De acordo com

Graur & Li (2000), as substituições sinônimas refletem melhor a história evolutiva de um táxon do que as não-sinônimas, pois, teoricamente, não são influenciadas pela pressão seletiva. Ademais, deve se ressaltar que as substituições sinônimas ocorrem invariavelmente com maior frequência do que as não sinônimas.

Outro aspecto importante na variação da taxa de substituição nucleotídica é a localização do segmento estudado. O genoma é dividido em duas regiões, uma que contém genes ou suas seqüências regulatórias, denominada de região codificadora, e outra aparentemente sem função, a região não-codificadora. Ao comparar as taxas de substituições nessas duas regiões genômicas observa-se uma nítida diferença entre elas. Calcagnotto (2001) relata que a região não-codificadora apresenta taxas de evolução superiores a codificadora. Em resumo, a taxa de substituição de um gene é um bom indicativo de sua importância funcional e a comparação das taxas entre diferentes genes fornece informações valiosas sobre fatores históricos e demográficos (MUSE, 2000).

Todo processo de análise filogenética deve-se iniciar através da investigação para a escolha do modelo de substituição nucleotídica mais adequado para a proposta estudada. A escolha de um modelo adequado pelo programa MODELTEST fundamenta-se no teste da razão de verossimilhança (LRT) que permite justificar a escolha de um modelo dentro de uma lógica estatística. Os escores de uma mesma árvore podem ser calculados sob modelos evolucionários progressivamente mais complexos (encadeados) e comparados estatisticamente através da LRT e o seu valor de probabilidade associado. A LRT usa uma distribuição qui-quadrado com q graus de liberdade, diferença entre os números de parâmetros livres entre os dois modelos, para aceitar ou não diferentes hipóteses sobre o processo de substituição de DNA (SCHNEIDER, 2003).

Segundo Miyaki et al. (2001), o conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestralidade entre as espécies. Assim, pode-se definir filogenia como a

indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies. A reconstrução filogenética baseia-se em estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos ou táxons. Logo, uma árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos presentes nela; graficamente, consiste de pontos (ou nós) ligados por linhas ou ramos. Os táxons podem ser famílias, gêneros, espécies ou populações, ou seja, qualquer nível taxonômico sobre os quais se deseja inferir a história evolutiva.

Os métodos conhecidos para construção de árvores filogenéticas podem ser baseados em matrizes de distância ou em análise de estados do caráter. No primeiro grupo estão alocados os métodos de agrupamento não ponderado de pares baseados na média aritmética (UPGMA), dos quadrados mínimos (LS=least squares), de evolução mínima (ME) e de agrupamento de vizinhos (NJ= neighborjoining). No segundo grupo estão os métodos da máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e interferência bayesiana (IB) (SCHNEIDER, 2003).

O método de evolução mínima é baseado na procura da árvore com a menor soma total dos ramos (SAITOU & NEI, 1987). No entanto, esse método descrito inicialmente apresentava pouca praticidade devido à demora na análise, uma vez que todas as possíveis árvores tinham que ser construídas e a soma total dos seus ramos estimados, para que a árvore ótima com soma mínima fosse encontrada. Entretanto, quando o número de táxons é maior do que 30, o número possível de árvores é muito grande e, com isso, o tempo computacional requerido é impraticável.

Para superar essa dificuldade foi proposto um algoritmo heurístico para a construção da árvore de evolução mínima. Esse algoritmo heurístico foi chamado de agrupamento de vizinhos, em que a evolução mínima está implícita a cada passo do algoritmo, produzindo uma única árvore final. Desse modo, tanto o método de evolução mínima como o de agrupamento de vizinhos apresentam como resultado uma única árvore e com características muito próximas.

O método da máxima parcimônia é considerado muito simples em sua concepção. Esse método é baseado na suposição de que a árvore mais provável é a que requer o menor número de mudanças para explicar toda a variação observada na matriz de caracteres ou alinhamento das seqüências (MIYAKI et al., 2001).

Na reconstrução filogenética pela máxima parcimônia, os sítios informativos são os mais importantes, visto que nem toda a variabilidade das seqüências é útil para este método, pois aqueles que apresentarem variação em uma única seqüência adicionarão um passo para qualquer uma das árvores consideradas. Portanto, em primeiro lugar, os sítios informativos são selecionados. Em seguida, para cada uma das árvores possíveis, o número de substituições em cada sítio informativo é inferido e o total, para cada uma das árvores possíveis, é calculado (SCHNEIDER, 2003).

Diante de todos esses dados verificou-se a necessidade de estudos da síndrome da imunodeficiência felina, do FIV e dos genótipos existentes no Brasil, uma vez que não há publicações relacionadas a este assunto, especialmente no estado de São Paulo e também com um maior número de amostras. Assim a genotipagem de amostras do FIV, bem como a determinação da freqüência da doença, é de fundamental importância. Além disso, o seqüenciamento de nucleotídeos do DNA pró-viral fornecerá dados importantes da epidemiologia que podem sugerir a origem desses vírus.

“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades”.

Maxwell Maltz

Objetivos

2.- Objetivos

O presente trabalho teve por principais objetivos:

- Determinar a prevalência da infecção pelo FIV em 519 gatos domésticos provenientes de várias cidades do estado de São Paulo utilizando-se o método de PCR-Nested.
- Correlacionar a prevalência da infecção a dados epidemiológicos dos animais.
- Promover a genotipagem das amostras positivas do FIV por meio do seqüenciamento do gene *gag* amplificado pela PCR.
- Avaliar a diversidade genética dos FIV identificados no estado de São Paulo e construir uma árvore genealógica a partir do seqüenciamento do gene *gag* das amostras obtidas.

*“Uma vida não basta ser vivida, precisa
ser sonhada”.*

Mário Quintana

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em três etapas com um intervalo de doze meses entre cada uma delas. Na primeira etapa foram colhidas todas as amostras de sangue total dos gatos e procedeu-se a extração de DNA e a técnica de PCR-nested para identificação dos animais positivos. Na segunda etapa, foram avaliadas apenas as amostras positivas pela técnica de PCR. Nessa etapa, as amostras positivas que apresentaram bandas ao PCR foram preparadas e quantificadas para o seqüenciamento genético, e posteriormente analisadas através de programas de bioinformática.

3.2. Animais

No período de outubro de 2000 a dezembro de 2001 foram selecionados aleatoriamente 519 gatos domésticos atendidos em clínicas veterinárias particulares e residentes em abrigos de animais localizados em várias cidades do Estado de São Paulo e no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista/Unesp, Campi de Botucatu-SP, como pode ser observada na figura 3.

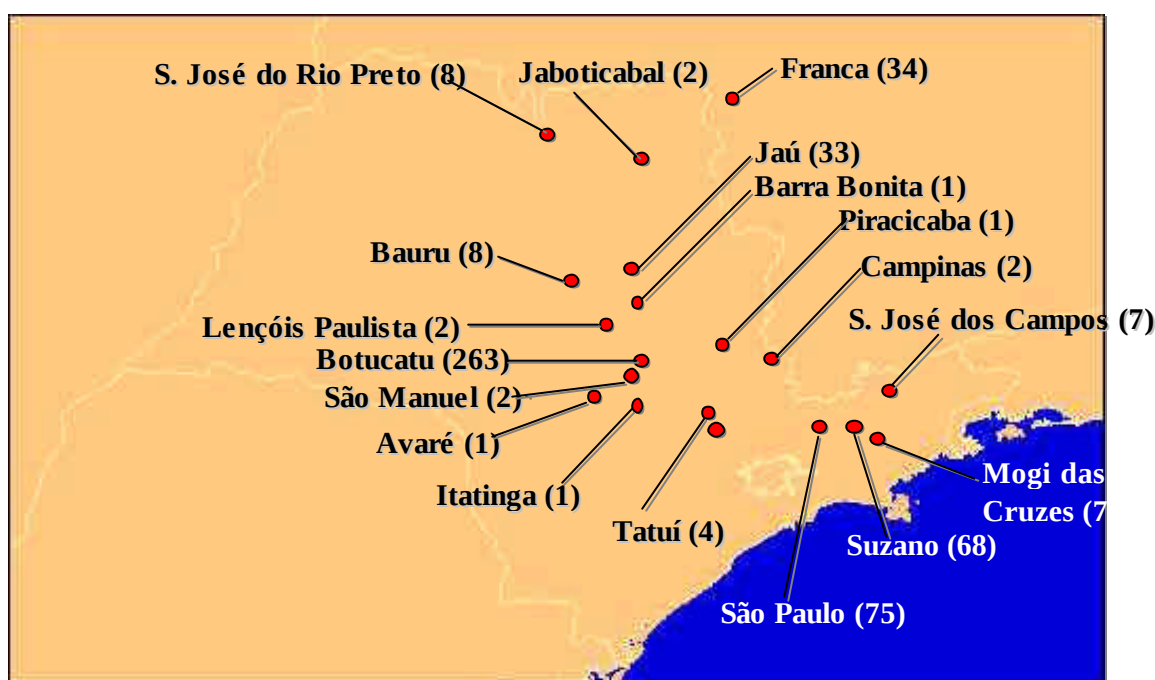


Figura 3- Distribuição da região geográfica do estado de São Paulo onde foram colhidas as amostras de sangue total dos 519 gatos domésticos selecionados para o diagnóstico da imunodeficiência felina

Formulários individuais foram preenchidos discriminando dados como sexo, raça, idade, cidade de origem, número de contactantes, acesso à rua, castração e sinais clínicos, quando presentes. Posteriormente, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o estado fisiológico: *Grupo I*, animais assintomáticos, *Grupo II*, animais com sinais clínicos inespecíficos/enfermos. Entretanto, algumas amostras obtidas para este estudo foram enviadas ao laboratório de virologia do departamento de microbiologia e imunologia do Instituto de Biociências-IB, Unesp, Botucatu- São Paulo por profissionais autônomos e não continham os dados clínicos dos animais. Assim, essas amostras foram protocoladas em um terceiro grupo: *Grupo III*: não avaliados. Na tabela 1, está sumarizada a distribuição dos gatos domésticos dentro dos três grupos formados e com relação ao sexo dos mesmos.

Tabela 1- Distribuição do número total de gatos domésticos selecionados para o diagnóstico dos *vírus da imunodeficiência felina* de acordo com a forma clínica e o sexo

Grupo	Forma clínica	Sexo		Total(%)
		Macho (%)	Fêmea(%)	
I	Assintomaticos	131(43,66)	169(56,33)	300(57,80)
II	Sinais clínicos inespecíficos/Enfermos	86(55,84)	68(44,15)	154(29,67)
III	Não avaliados	33(50,76)	32(49,23)	65(12,52)
Total		250(48,16)	269(51,83)	519(100)

3.3.Amostras

As amostras de sangue total foram colhidas com seringa descartável de 3 mL através de punção da veia jugular e colocadas em tubos estéreis contendo anticoagulante e mantidas à temperatura de 8°C para posterior processamento.

3.4.Teste de viabilidade das amostras

Três amostras de sangue, colhidas conforme descrito no item anterior, e que posteriormente à reação de PCR-Nested se mostraram positivas, foram mantidas em temperatura de 8°C e seu DNA extraído a cada duas semanas para a verificação do período em que as mesmas permaneceram positivas.

3.5.Extração do DNA das amostras

O DNA proviral foi extraído diretamente do sangue dos animais utilizando-se GFX Genomic Blood DNA Purification Kit[®] (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o protocolo do fabricante. Após a diluição do material extraído a 1% em água ultrapura (MilliQ[®]) autoclavada, o DNA foi analisado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 e 280 nm, para determinação da concentração e da pureza. Após análise, as amostras que apresentaram concentração muito baixa ou razão entre a D.O. 260/D.O.280 menor que 1,7 foram submetidas à nova extração.

3.6.PCR-Nested

Para realização do PCR-nested foi utilizada a metodologia proposta por Hohdatsu *et al.* (1998), com modificações. Essa técnica foi utilizada em todas as amostras e serviu como teste de triagem para a identificação das positivas, as quais posteriormente foram submetidas ao seqüenciamento genético.

3.6.1 Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“Primers”)

Foram desenhados quatro “primers” (quadro 1) capazes de amplificar fragmentos de 329 pares de bases (pb) do gene *gag* (posição 1036-1364 de acordo com a seqüência das estirpes Petaluma, PPR, Sendai-1, TM-2, Aomori-1, Aomori-2, Yokohama, Shizuoka e Fukuoka), correspondente à região P17-P24 deste gene (HOHDATSU *et al.*,1998).

Na reação de PCR foi utilizado o par de “primer” externo FIV PCR-A2 e FIV PCR-S2 e na reação de PCR-Nested, o par interno FIV NESTED-A e FIV NESTED-S (figura 4).

Quadro 1- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar um fragmento de 329pb do gene *gag* do *vírus da imunodeficiência felina*, segundo Hohdatsu et al. (1998)

PRIMER	SEQUÊNCIA
FIV PCR-A2	5' ACT TCT TGG CAG GCC CTC AG 3'
FIV PCR-S2	5' AAG GAC CTC CAC AGG CTT ATC C 3'
FIV NESTED-A	5' CTG CTT GTT GTT CTT GAG TT 3'
FIV NESTED-S	5' TAT TCA AAC AGT AAA TGG AG 3'

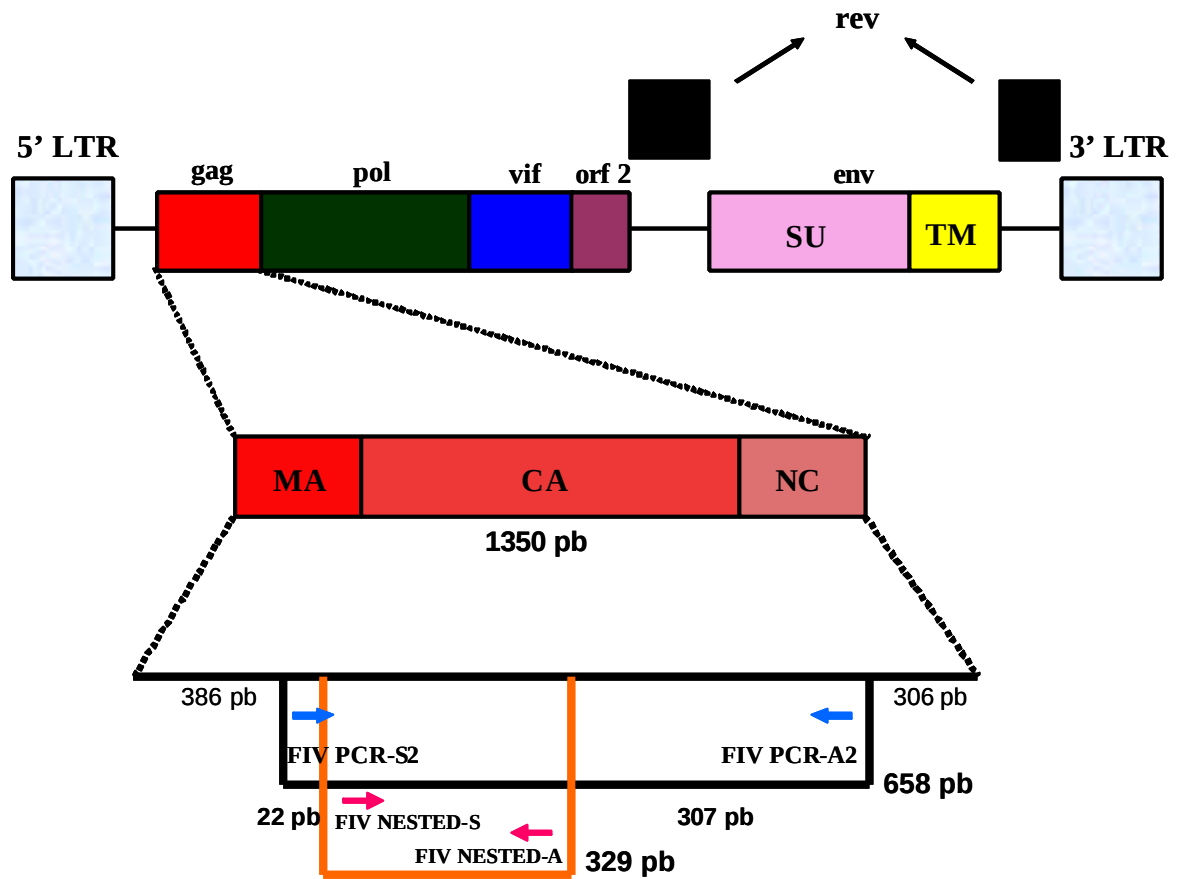


Figura 4- Representação esquemática do genoma do vírus da imunodeficiência felina com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR. Genes estruturais, *gag-pol-env* (proteínas do envelope, SU=superfície, TM=transmembrana) e genes suplementares *vif* - *orf 2* – *rev*. Proteínas codificadas pelo gene *gag*, MA=Matriz, CA= Capsídeo e NC= Nucleocapsídeo. FIV PCR-S2 e FIV PCR-A2= primers externos (primeira PCR); FIV NESTED-S e FIV NESTED-A= primers internos (segunda PCR)

3.6.2 Amplificação do DNA viral

Foram realizadas duas reações, sendo que na primeira utilizou-se os oligonucleotídeos FIV PCR A2 e FIV PCR S2 e o DNA extraído do sangue do animal e na segunda, os oligonucleotídeos internos FIV NESTED A e FIV NESTED S e o produto da primeira reação. Ambas foram realizadas em um volume final de 25µl contendo uma unidade de *Tth* DNA Polimerase (Biotools[®]), 2,5µl de tampão de PCR 10X (Biotools[®]), 1µl de cada “primer” (FIV PCR A2 e FIV PCR S2 na primeira reação ou FIV NESTED A e FIV NESTED S na segunda reação) a 10pmol/µl, 0,8µl de MgCl₂ (50mMol/L, Biotools), 0,25µl de dNTPs (10 mM Gibco BRL), e 5µl do DNA extraído da amostra de sangue do animal na primeira reação e 2µl do produto de PCR na segunda reação.

A amplificação foi realizada em termociclador automático (Eppendorf[®]). Numa etapa inicial, as amostras foram incubadas a 96° C por 4 min, após prévio aquecimento da tampa por 2 min, para as desnaturações, seguida de uma sequência de 30 ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 94° C/1min para desnaturação da fita de DNA, 58°C na primeira reação (PCR) e 55°C na segunda reação (PCR-nested)/1min para a hibridização dos “primers” e 72°C por um minuto e meio para a extensão das fitas. Ao final, foi realizada uma incubação a 72°C/5min para garantir a presença dos DNAs amplificados em fita dupla.

Os produtos obtidos na amplificação pela técnica de PCR-nested foram analisados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml) e examinados comparativamente com marcadores de DNA de 123 pb (Gibco-BRL[®]), com auxílio de transiluminador UV, sendo considerados positivos aqueles com tamanho aproximado de 329 pb.

3.7 Seqüenciamento Genético

3.7.1 Amostras positivas

Para o seqüenciamento genético foram utilizados os fragmentos de DNA de aproximadamente 658pb das amostras positivas amplificadas pela reação de PCR através do par de “primer” externo FIV PCR-A2 e FIV PCR-S2.

Durante o processamento das amostras positivas observou-se que algumas apresentavam bandas fracas na reação de PCR. Mediante essa observação, essas amostras foram submetidas a uma segunda reação de PCR, na qual utilizou-se o produto da primeira amplificação. Mesmo após essa conduta, algumas amostras ainda apresentavam bandas fracas na segunda amplificação. Com isso, essas amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, na qual visualizaram-se as bandas positivas com auxílio de transiluminador UV. Posteriormente, as mesmas foram extraídas e purificadas do gel através do GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, inc.). A partir dessas, realizou-se uma nova reação de PCR utilizando-se o produto purificado do gel.

3.7.2 Purificação do Fragmento Amplificado do Gel de Agarose

Para a reação do seqüenciamento, todos os fragmentos amplificados, independentemente do protocolo supracitado, foram purificados do gel de agarose a 1% utilizando-se o GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, inc.) de acordo com as especificações do fabricante.

3.7.3 Quantificação dos fragmentos de DNA

Após a extração e a purificação do fragmento amplificado, o mesmo foi submetido à quantificação. Para essa etapa, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, na qual, além das amostras a serem quantificadas aplicou-se um marcador de massa “Low DNA mass ladder”[®] (Life Technologies). A quantificação foi feita através da comparação visual entre o fragmento amplificado e a banda do marcador molecular. Nesse marcador, cada banda apresentava uma quantidade de DNA (ng-nanograma) pré-determinada pelo fabricante.

3.7.4 Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento automático foi utilizado o DYEnamic[®] ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences), seguindo o protocolo abaixo:

Para cada reação foi utilizado 5,0µl (40-80ng) de DNA purificado obtido pela reação da PCR, 1,0µl (5pmol/µl) de “primer” FIV PCR A2 ou S2, conforme o sentido do seqüenciamento, 8,0µl do Premix e água Ultra-pura (MilliQ[®]) suficiente para completar o volume final de 20µl.

Após a homogeneização, a reação foi submetida ao termociclador automático (Mastercycler Gradient, Eppendorf[®]), no qual foram realizados 25 ciclos de 95°C/20 s para desnaturação da fita de DNA, 55°C/15 s para a hibridização dos “primers” e 60°C/1min para a extensão da fita de DNA.

Em seguida à amplificação, o DNA foi purificado através da precipitação com o etanol, de acordo com o manual do kit comercial DYEnamic[®] ET Terminator Cycle

Sequencing Kit (Amersham Biosciences). Posteriormente a essa etapa, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% em um seqüenciador automático modelo ABI Prism® 377 DNA Sequencers (Applied Biosystems).

3.8 Alinhamento das seqüências do gene gag do vírus da imunodeficiência felina

Após determinar as seqüências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados pela reação de PCR a partir do gene *gag* através da reação de seqüenciamento descrita anteriormente, às mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalX , versão 1,8 para Windows (THOMPSON et al., 1997). Para analisar a qualidade da leitura dos cromatogramas obtidos foi utilizado o programa PHRED, o qual aceita como critério de validação de qualidade somente as leituras que tenham pontuação de no mínimo 20. Como referência para o alinhamento das seqüências obtidas, foi utilizada uma amostra do FIV publicada no GenBank com número de acesso M25381.

3.9 Análise Genealógica

Para determinar o modelo evolutivo mais adequado para substituição de nucleotídeos das seqüências obtidas foi realizado o teste de razão de verossimilhança (LRT) (HUELSENBECK & RANNALA, 1997) com o auxílio do programa Modeltest (POSADA & CRANDALL, 1988).

Os valores de consistência (FELSENSTEIN, 1978) foram obtidos através do teste de bootstrap (EFRON, 1979) com o programa PAUP v.4 (SWOFFORD, 2002), assumindo o valor de 1000 réplicas através do método de busca heurística (THOMPSON et al., 1997) e com retenção de grupos com freqüência acima de 50%.

As árvores genealógicas foram construídas com o auxílio do programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 2.0 para Windows (KUMAR et al., 2000) e PAUP v.4 (SWOFFORD, 2002).

4- Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste do χ^2 (Qui-quadrado) (CALLEGARI-JACQUES, 2003) para o estudo de associação e/ou comparação de proporções de animais positivos para o *vírus da imunodeficiência felina*, classificados segundo o quadro clínico e o sexo. Em todos os resultados são apresentadas as significâncias observadas nos testes.

“Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade, pela sorte, mas nunca sem trabalho”.

A. Destoef

Resultados

4- Resultados

4.1 Animais positivos a PCR-nested

Das 519 amostras de sangue total de gatos domésticos avaliadas pela PCR-nested foi possível detectar um percentual de 15,6% (81/519) de positividade para infecção pelo FIV. Na figura 5, encontra-se a distribuição dos gatos positivos de acordo com a cidade de origem.

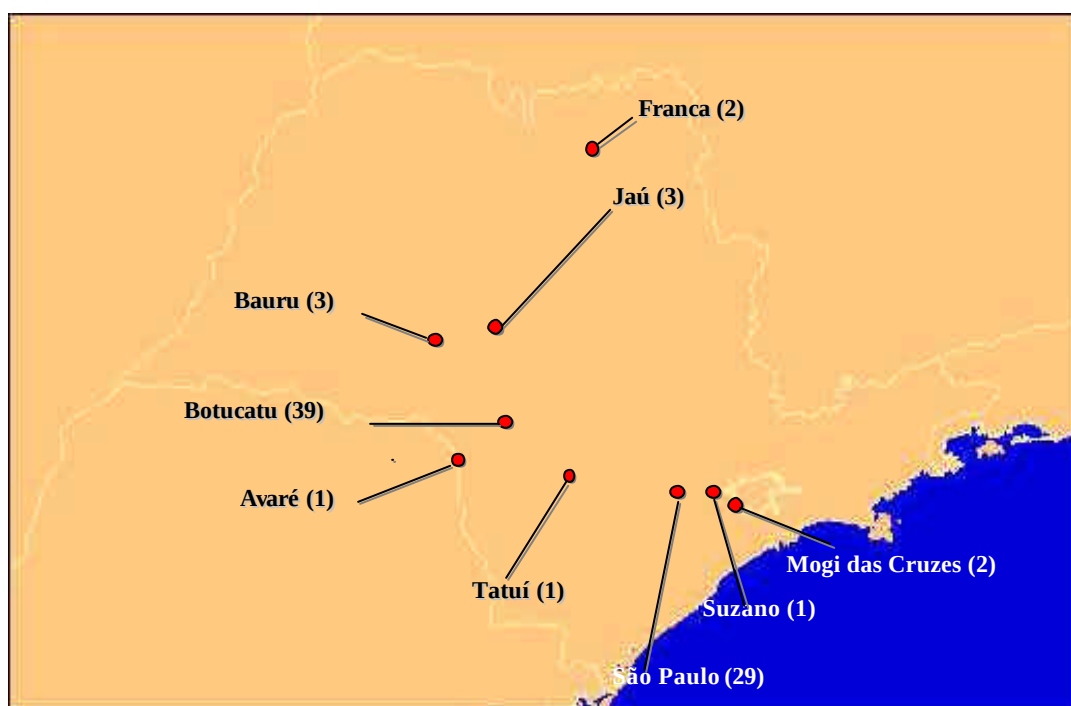


Figura 5- Distribuição geográfica dos gatos domésticos positivos à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina de acordo com a cidade de origem do estado de São Paulo, Brasil

A tabela 2 apresenta a percentagem de animais positivos e negativos à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina de acordo com o estado fisiológico dos animais estudados e o sexo dos mesmos.

Tabela 2- Percentagem de animais positivos e negativos para o *vírus da imunodeficiência felina*, classificados de acordo com o estado clínico e sexo

Grupo	N	Macho		Fêmea		TOTAL
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
I	300	6,7%	37,0%	0,7%	55,6%	100%
II	154	15,6%	40,2%	13,7%	30,5%	100%
III	65	16,9%	33,9%	4,6%	44,6%	100%
TOTAL	519	10,6%	37,6%	5,0%	46,8%	100%

Grupo I- assintomáticos; grupo II- enfermos e grupo III- sem avaliação clínica.

N= número de animais.

Na análise estatística, referente à associação dos animais positivos frente aos diferentes grupos clínicos estudados obteve-se como valor do $\chi^2 = 38.998$, com grau de liberdade 2 e $P < 0.0001$. Mediante esse resultado podê-se inferir que as frequências observadas entre os grupos clínicos e a positividade dos animais diferiram significativamente. Com relação ao sexo e a positividade dos animais estudados obteve-se um valor de $\chi^2 = 14.046$, com grau de liberdade 1 e $P = 0.0002$ demonstrando uma diferença extremamente significativa entre estas variáveis.

Com relação à idade dos animais positivos, não foi possível classificá-los dentro de faixas etárias, uma vez que, em muitos locais aonde havia concentração de gatos não havia como precisar a idade dos mesmos.

No quadro 2 observa-se os dados referente as 81 amostras positivas a PCR-nested com seus dados concernentes à cidade de origem, sinais clínicos, sexo.

Quadro 2- Distribuição das 81 amostras positivas para os *vírus da imunodeficiência felina*, de acordo com suas características de origem, sexo e sinais clínicos

Amostra	Origem	Sexo	Sinais clínicos
BT-02	Botucatu	Macho	Infecção respiratória e neuropatia
BT-105	Botucatu	Macho	Sem avaliação clínica
BT-150	Botucatu	Fêmea	Assintomática
BT-161	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-175	Botucatu	Macho	Sem avaliação clínica
BT-218	Botucatu	Fêmea	Cistite
BT-269	Botucatu	Macho	Linfoadenopatia generalizada
BT-271	Botucatu	Macho	Sem avaliação clínica
BT-303	Botucatu	Fêmea	Abscessos
BT-307	Botucatu	Fêmea	Infecção respiratória
BT-310	Botucatu	Macho	Neuropatia
BT-335	Botucatu	Macho	Vômitos e icterícia
BT-337	Botucatu	Fêmea	Neuropatia
BT-338	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-339	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-340	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-342	Botucatu	Fêmea	Demodicose
BT-343	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-344	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-346	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-347	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-348	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-353	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-357	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-359	Botucatu	Fêmea	Dermatite
BT-361	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-362	Botucatu	Fêmea	Conjuntivite
BT-380	Botucatu	Fêmea	Dermatofilose
BT-391	Botucatu	Macho	Dermatofilose
BT-394	Botucatu	Macho	Dermatofilose
BT-395	Botucatu	Macho	Dermatofilose
BT-402	Botucatu	Macho	Assintomático
BT-406	Botucatu	Macho	Infecção urinária
BT-408	Botucatu	Macho	Otite média crônica e abscessos
BT-412	Botucatu	Macho	Infecção urinária
BT-507	Botucatu	Macho	Caquexia e icterícia
BT-508	Botucatu	Macho	Diarréia crônica
BT-515	Botucatu	Fêmea	Dermatofilose
BT-517	Botucatu	Macho	Diarréia crônica e emagrecimento
BR-157	Bauru	Macho	Sem avaliação clínica
BR-158	Bauru	Macho	Sem avaliação clínica
BR-485	Bauru	Macho	Infecção respiratória
AV-62	Avaré	Macho	Diarréia, emese e emagrecimento

Quadro 2- Distribuição das 81 amostras positivas para os vírus da imunodeficiência felina, de acordo com suas características de origem, sexo e sinais clínicos (continuação)

TT-61	Tatuí	Macho	Dermatite
FR-313	Franca	Fêmea	Sem avaliação clínica
FR-317	Franca	Fêmea	Sem avaliação clínica
SP-05	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-08	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-165	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-166	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-169	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-170	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-171	São Paulo	Fêmea	Estomatite
SP-172	São Paulo	Fêmea	Gengivite
SP-173	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-174	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-419	São Paulo	Fêmea	Otite média
SP-420	São Paulo	Macho	Assintomático
SP-421	São Paulo	Fêmea	Abscessos
SP-422	São Paulo	Fêmea	Dermatofitose
SP-423	São Paulo	Fêmea	Dermatofitose
SP-428	São Paulo	Fêmea	Dermatofitose
SP-429	São Paulo	Fêmea	Dermatofitose
SP-439	São Paulo	Fêmea	Infecção respiratória
SP-442	São Paulo	Macho	Vômitos e emagrecimento
SP-443	São Paulo	Fêmea	Sem avaliação clínica
SP-444	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-445	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-446	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-447	São Paulo	Macho	Sem avaliação clínica
SP-452	São Paulo	Macho	Dermatofitose
SP-456	São Paulo	Fêmea	Conjuntivite
SP-457	São Paulo	Fêmea	Periodontite
SP-458	São Paulo	Macho	Emagrecimento progressivo
SP-459	São Paulo	Fêmea	Caquexia
JA-261	Jaú	Macho	Alopecia
JA-263	Jaú	Macho	Tumor bucal
JA-264	Jaú	Macho	Caquexia
MC-283	Mogi das Cruzes	Macho	Periodontite crônica
MC-312	Mogi das Cruzes	Macho	Hemobartonelose
SZ-418	Suzano	Fêmea	Assintomática

BT=Botucatu; BR= Bauru; SP= São Paulo; JÁ= Jaú; MC= Mogi das Cruzes; SZ= Suzano.

4.2 Teste de viabilidade das amostras

Foi verificado que as amostras testadas mantidas a temperatura de 8°C se mantiveram viáveis por até três meses.

4.3 Amplificação do DNA das amostras do Vírus da Imunodeficiência pela PCR-nested

A figura 6 destaca o produto da amplificação de DNA do FIV pela técnica da PCR utilizando os “primers” FIV-PCR A2 e FIV-PCR S2, e da PCR-nested utilizando os primers FIV-PCR A2 e FIV-PCR S2, como par externo, e os primers FIV-Nested A e FIV-Nested S, como par interno. Nessa figura, podem-se observar os produtos da amplificação da PCR com os tamanhos de bandas de 658 pb e dos da PCR-nested de 329 pb.

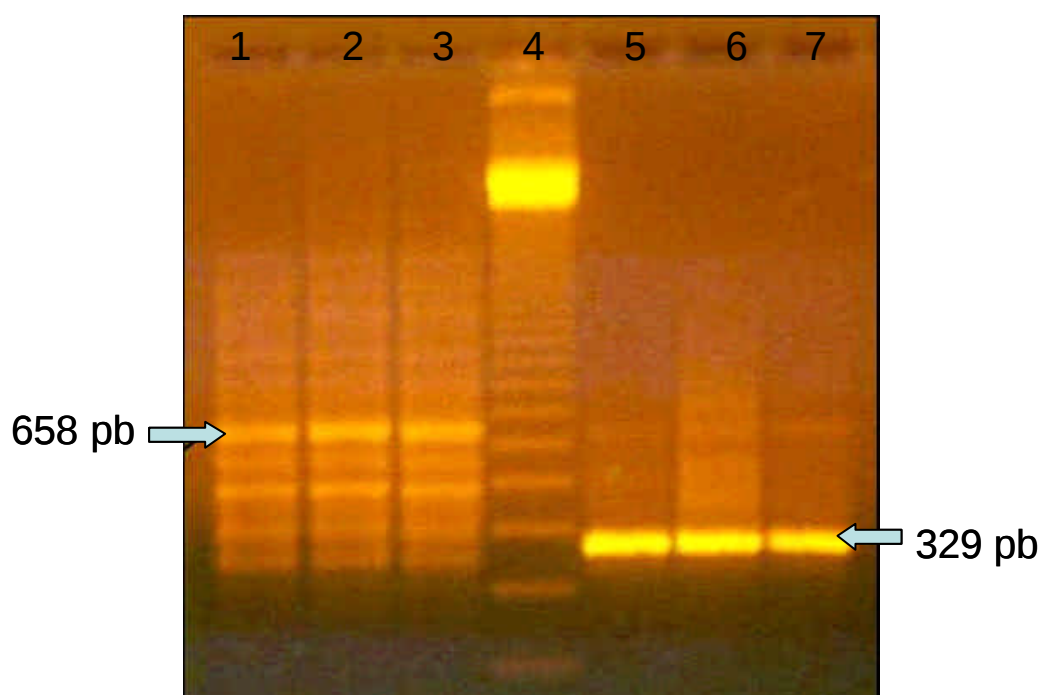


Figura 6. Resultado da amplificação de DNA do vírus da imunodeficiência felina pela reação da PCR e PCR-Nested utilizando os primers FIV-PCR A2 e FIV-PCR S2, e FIV-NESTED A e FIV-NESTED S. A. Colunas 1, 2 e 3: são observadas bandas positivas da reação de PCR; Coluna 4: Padrão de Peso Molecular 123 pb (Gibco, BRL®); Colunas 5, 6 e 7: bandas positivas da reação do PCR-Nested

4.4 Purificação do Fragmento Amplificado

Na figura 7, pode-se observar o produto da amplificação do PCR purificado do gel de agarose a 1%.

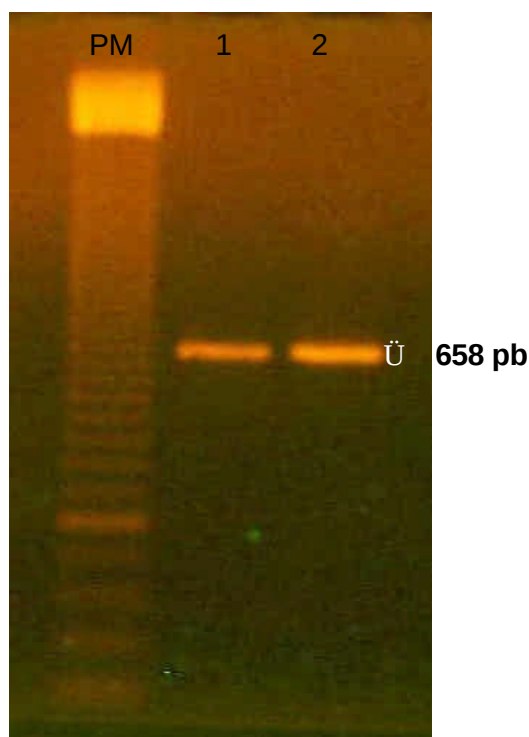


Figura 7- Resultado da purificação dos fragmentos amplificados pela PCR e extraídos do gel de agarose a 1% utilizando o “Kit” comercial GFX PCR DNA and gel Band Purification. PM= padrão de peso molecular 50pb (Gibco, BRL[®]); 1= BT-02 e 2= SP-05. BT= Botucatu; SP= São Paulo

4.5 Quantificação do fragmento amplificado pelo PCR

A figura 8 apresenta o gel de agarose a 1,5% utilizado para a quantificação dos fragmentos de DNA obtidos pela PCR, os quais foram utilizados no sequenciamento genético.

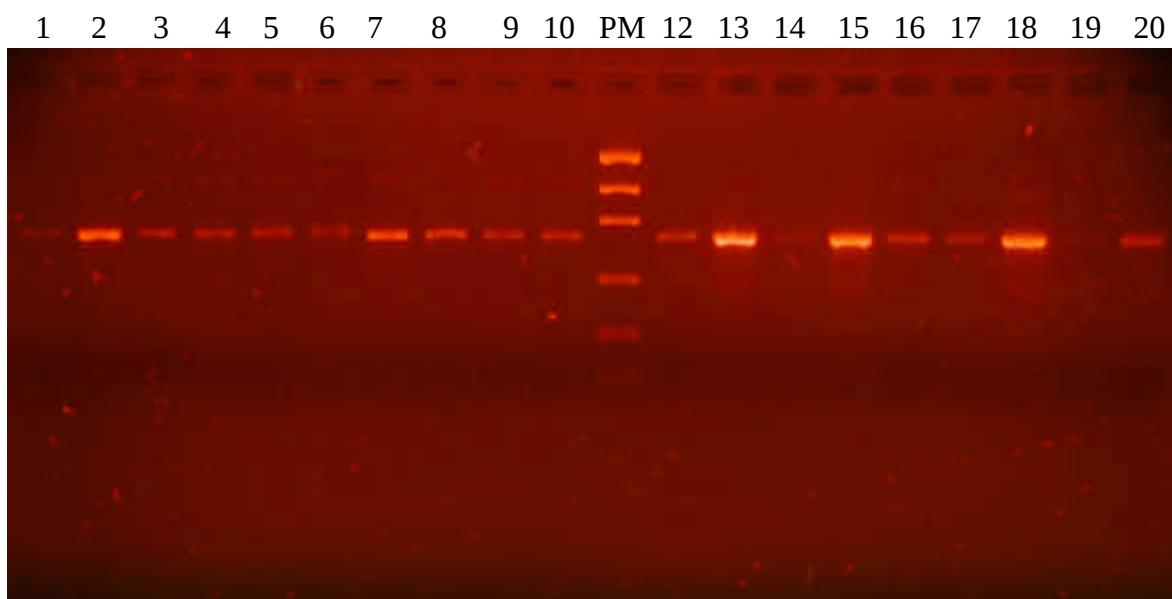


Figura 8- Visualização do gel de agarose 1,5% utilizado para a quantificação dos fragmentos de DNA do *vírus da imunodeficiência felina*. PM = Low DNA mass ladder® (Life Technologies), bandas de 10, 20, 40, 80, 120 e 200ng de DNA; 1= BT-02; 2= SP-05; 3= SP-165; 4= BT-395; 5= BT-402; 6= BT-406; 7= BT-408; 8= SZ-418; 9= SP-419; 10= SP-420; 11= PM; 12= SP-421; 13= JA-261; 14= JA-263; 15= BT-271; 16= JÁ-264; 17= BT-105; 18= BR-485; 19= BT-507; 20= 515. BT= Botucatu; SP= São Paulo; SZ= Suzano; JÁ= Jaú; BR= Bauru

4.6 Reação de Seqüenciamento

Após a amplificação, purificação e quantificação, foi realizada a reação de seqüenciamento das amostras positivas. Porém, nem todas as amostras positivas foram seqüenciadas e/ou aproveitadas na análise filogenética. Devido à baixa quantificação de DNA, foram utilizadas apenas as amostras que atingiram o valor aproximado de 20ng de DNA; e as seqüências de nucleotídeos seqüenciadas que obtiveram qualidade, durante o seqüenciamento. Com isso, do total de 81 amostras positivas, na reação de PCR-nested, foram seqüenciadas 50 (61,7%) e em 32 (64%) obtiveram-se resultados satisfatórios para a inferência filogenética.

Da sequência de nucleotídeos da reação do PCR (658pb) utilizada nas 50 amostras positivas seqüenciadas obteve-se um fragmento de 459pb e este foi submetido ao alinhamento com o auxílio do Clustal X (THOMPSON et al., 1997), como referência utilizou-se a estirpe de referência Petaluma, número de acesso no GenBank M25381. A figura 9 apresenta-se o esquema gráfico da localização das seqüências de nucleotídeos, dentro do fagmento do PCR, obtidas na análise genética.

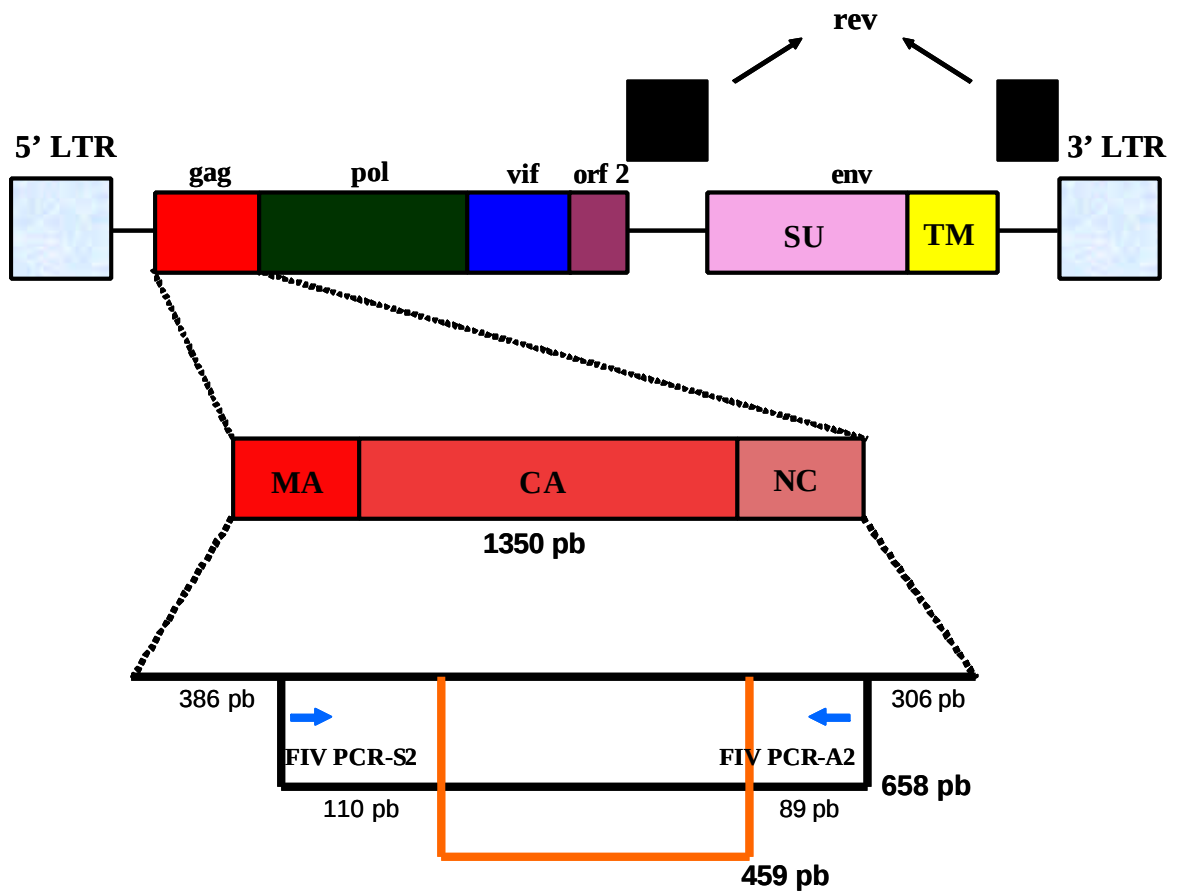


Figura 9 Representação esquemática do genoma do *vírus da imunodeficiência felina* com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR. Genes estruturais, *gag-pol-env* (proteínas do envelope, SU=superfície, TM=transmembrana) e genes suplementares *vif - orf 2 - rev*. Proteínas codificadas pelo gene *gag*, MA=Matriz,, CA= Capsídeo e NC= Nucleocapsídeo. FIV PCR-S2 e FIV PCR-A2= “primers” utilizados na reação da PCR-fragmento obtido de 658pb. Seqüência obtida na análise genética- 459pb

#BT02	GGA	GGT	GAG	GAG	GTC	CAA	CTG	TGG	TTC	ACA	GCC	TTT	TCA	GCT	AAT	TTA	ACA
#BT105	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT269	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT271	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT303	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT310	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT395	...	...	...	...	A	...	...	T	T	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT402	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT406	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT408	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT507	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT508	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT515	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT517	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP05	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP08	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP165	...	...	...	C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP419	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP420	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP421	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP428	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP439	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C	...
#SP442	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP452	...	...	...	...	...	A	T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SP457	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#JA261	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C	...	...	...	...	...
#JA263	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#JA264	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#MC283	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#MC312	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BR485	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#SZ418	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#D37819Yokohama	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C	...	A	...	...	...
#D37824Aomori2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#D37823Aomori1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#D37821Sendai2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A	...	...
#AF361320Maryland	...	...	...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	T	...	...	G	...
#M25381Petaluma	...	...	...	A	T	...	A	...	T	T	...	C	T	A	...	...	...
#M36968SanDiego	...	...	...	A	T	...	A	...	T	...	...	C	T	A	...	...	...
#D37820Sendai1	...	...	...	A	T	...	A	...	T	T	...	C	T	A	...	...	...
#D37818Shizuoka	...	A	...	...	...	...	A	...	T	T	A	...	...	...	...	C	...
#D37822Fukuoka	...	A	...	A	T	...	T	A	...	T	T	A	...	...	...	...	...
#AF474246SubtypeC	...	...	A	A	T	...	T	A	...	T	...	T	...	G	C	...	G
#BT02	TCA	ACT	GAT	ATG	GCT	ACC	TTA	ATT	ATG	TCC	GCA	CCT	GGC	TGT	GCA	GCA	GAT
#BT105	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT269	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT271	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#BT303	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

#M36968SanDiego			A	T	G			.GC	.A	.G		T.		.A	.A		.G
#D37820Sendai1			A	T				.GC	.A	.G		T.		.A	.A		
#D37818Shizuoka	.G	.G		T				.T	.A		G			.G			.A
#D37822Fukuoka	.G		T	T			.G	.T	.A	G		.G		.G			.A
#AF474246SubtypeC			A	T			.G	.AT	.A		.G	T.		.A	.A		A.A
#BT02	ACC	CAT	CCT	CCT	GAT	GGG	CCT	AGA	CCA	CTA	CCC	TAT	TTT	ACT	GCC	GCG	GAG
#BT105																	
#BT269																	
#BT271																	
#BT303																	
#BT310																	
#BT395								.G	.G	.G	.T		.C				
#BT402																	
#BT406																	
#BT408																	
#BT507																	
#BT508																	
#BT515																	
#BT517																	
#SP05																	
#SP08																	
#SP165																	
#SP419																	
#SP420																	
#SP421																	
#SP428									.G	.G			.C				
#SP439																	.A
#SP442																	
#SP452										.G							
#SP457																A	
#JA261	.A									.G							
#JA263																	
#JA264																	
#MC283									.G	.G			.C				
#MC312									.G	.G			.C			A	.A
#BR485										.G							.A
#SZ418																	
#D37819Yokohama									.G	.G			.C			A	
#D37824Aomori2									.G	.G			.C			A	
#D37823Aomori1									.G	.G			.C			A	
#D37821Sendai2									.G	.G			.C			A	
#AF361320Maryland									.G	T.G						T	A
#M25381Petaluma	.A		.C			.CT	.C			T.						.A	.A
#M36968SanDiego	.A	A.	.C			.T				T.						.A	.A
#D37820Sendai1	.A		.C			.CT				T.						.A	.A
#D37818Shizuoka		.C		.G		.A	.C		.T	.G	.A					.A	.A
#D37822Fukuoka		.C		.G		.A	.C										

Figura 11- Sequências de aminoácidos do gene gag do vírus da imunodeficiência felina dos 32 isolados neste trabalho e dos publicados anteriormente no GenBank, alinhadas com o auxílio do ClustalX. Para facilitar a visualização das diferenças, posições conservadas entre a primeira sequência e as demais foram substituídas por pontos

#BT02	GGEEVQLWFT	AFSANLTSTD	MATLIMSAPG	CAADKEILDE	TLKQMTAEYD	R
#BT105						.
#BT269						.
#BT271						.
#BT303						.
#BT310						.
#BT395	L.					.
#BT402						.
#BT406						.
#BT408						.
#BT507						.
#BT508						.
#BT515						.
#BT517						.
#SP05						.
#SP08	...D.					.
#SP165	...D.					.
#SP419						.
#SP420						.
#SP421						.
#SP428						.
#SP439		...F.				.
#SP442						.
#SP452	I.					.
#SP457						.
#JA261						.
#JA263						.
#JA264						.
#MC283						.
#MC312						.
#BR485						.
#SZ418						.
#D37819Yokohama						.
#D37824Aomori2					A.....	.
#D37823Aomori1				...V.		.
#D37821Sendai2				...G.		.
#AF361320Maryland						.
#M25381Petaluma		...P.	...A.		S...L	.
#M36968SanDiego		...P.	...A.		S...L	.
#D37820Sendai1		...P.	...A.		S...L	.
#D37818Shizuoka						.
#D37822Fukuoka					...E.	.
#AF474246SubtypeC		...P.	.V...A.	F.....G	N...L	.
#BT02	THPPDGRPL	PYFTAAEIMG	IGLTQEQQAE	PRFAPARMQC	RAWYLEALGK	L
#BT105			...T.			.
#BT269						.
#BT271						.
#BT303						.
#BT310						.
#BT395						.
#BT402						.
#BT406						.
#BT408						.

#BT507	.	.	.	.	.	.
#BT508	.	.	.	.	.	.
#BT515	.	.	.	.	.	.
#BT517	.	.	.	.	.	.
#SP05	.	.	.	.	.	.
#SP08	.	.	.	.	.	.
#SP165	.	.	.	.	.	.
#SP419	.	.	.	.	.	.
#SP420	.	.	.	.	.	.
#SP421	.	.	.	.	.	.
#SP428	.	.	.	.	.	.
#SP439	.	.	.	.	.	.
#SP442	.	.	.	.	.	.
#SP452	.	.	.	.	.	.
#SP457	.	.	.	.	.	.
#JA261	.	.	.	.	.	.
#JA263	.	.	.	.	.	.
#JA264	.	.	.	.	.	.
#MC283	.	.	.	.	.	.
#MC312	.	.	.	.	.	.
#BR485	.	.	.	.	.	.
#SZ418	.	.	.	.	.	.
#D37819Yokohama	.	.	.	.	.	.
#D37824Aomori2	.	.	.	P.	.	.
#D37823Aomori1	.	.	.	.	.	.
#D37821Sendai2	.	.	.	.	.	.
#AF361320Maryland	.	.	.	.	.	.
#M25381Petaluma	.A.	.	.	A.	.	.
#M36968SanDiego	.N.	.	.	A.	.	.
#D37820Sendai1	.A.	.	.	A.	.	.
#D37818Shizuoka	.	.	.	.	.	S.
#D37822Fukuoka	.	.	.	.	.	S.
#AF474246SubtypeC	.	.	.	.	.	.
#BT02	AAIKAKSPRA	VQLKQGAKED	YSSFIDRLFA	QIDQEQNTAE	VKLYLKQSLS	I
#BT105	.	.	.	.	.	.
#BT269	.	.	.	.	.	.
#BT271	.	.	.	.	.	.
#BT303	.	.	.	.	.	.
#BT310	.	.	.	.	.	.
#BT395	.	.	.	.	.	.
#BT402	.	.	.	.	.	.
#BT406	.	.	.	.	.	.
#BT408	.	T.	.	.	.	.
#BT507	.	.	.	.	.	.
#BT508	.	.	.	.	.	.
#BT515	.	.	.	D.	.	.
#BT517	.	.	.	.	.	.
#SP05	.	.	.	K.	.	.
#SP08	.	.	.	.	.	.
#SP165	.	.	.	H..G.	.Q.VS..F.	.
#SP419	.	P.	A.	.	.	.
#SP420	.	P.	A.	.	.	L
#SP421	.	P.	A.	.	.	L
#SP428	.	.	.	.	.	.
#SP439	.	.	A.	.	.	.
#SP442	.	.	.	.	.	.
#SP452	.	.	A.	K.	.Q.	.
#SP457	.	R.	A.	.	.	.
#JA261	.	E	A.	.	.	.
#JA263	.	.	.	.	.	.
#JA264	.	.	.	.	.	.
#MC283	.	.	.	.	.	.
#MC312	.	.	.	.	.	.
#BR485	.	P.	.	.	.	.

#SZ418		P....	..A.....				L
#D37819Yokohama							.
#D37824Aomori2						H....	.
#D37823Aomori1							.
#D37821Sendai2					T.		.
#AF361320Maryland							.
#M25381Petaluma		R.....					.
#M36968SanDiego		R.....					.
#D37820Sendai1		RH.....					.
#D37818Shizuoka	..L.....	..M...V...	.A.....				.
#D37822Fukuoka	..L.....	..M...V...	.A.....				.
#AF474246SubtypeC		...R..P....	.A.....			..T.....	L

4.8- Análise Genealógica

4.8.1- Determinação do modelo de substituição nucleotídica

Para a construção de uma árvore filogenética a partir de seqüências nucleotídicas é necessário construir uma matriz de distâncias evolucionárias baseadas em um modelo de substituição nucleotídica (SCHNEIDER, 2003). Desta maneira, para a determinação do modelo de substituição nucleotídica utilizou-se o teste de razão de verossimilhança (LRT) (HUELSENBECK & RANNALA, 1997) com o auxílio do programa Modeltest (POSADA & CRANDALL, 1998). O resultado demonstrou que para as seqüências analisadas o melhor modelo foi o de Tamura Nei (TAMURA & NEI, 1993) com distribuição gama no valor de 0,26.

4.8.2- Construção das árvores filogenéticas

Após os passos citados anteriormente, como o alinhamento das seqüências e a escolha do modelo evolutivo mais bem sucedido em explicar os dados, foram escolhidos para construção filogenética três métodos. Dentre esses, dois baseiam-se em matrizes de distâncias (a matriz de caracteres é transformada em uma matriz de distâncias) e um em análise de estados de caráter (os caracteres são analisados diretamente). Os dois métodos pertencentes ao primeiro grupo são a evolução mínima (ME) (RZHETSKY & NEI, 1992) e o método de agrupamento de vizinhos (NJ=neighbor-joining) (SAITOU & NEI, 1987). O método baseado em análise de estados de caráter escolhido para ser utilizado neste trabalho foi a máxima parcimônia (MP).

Na análise pelos três métodos de construção filogenética foram avaliados 43 táxons com 459 caracteres (seqüência de nucleotídeos com 459 pb). A análise das amostras pelo método da máxima parcimônia através da busca heurística resultou na obtenção de 100 árvores igualmente parcimoniosas com 321 passos e com índice de consistência (IC) de 0,67. A árvore construída pelo método supracitado foi obtida através dos seguintes parâmetros: do total de 459 nucleotídeos (nt) analisados 125nt foram considerados como sítios informativos para a parcimônia, 39nt como sítios não-informativos, 295 nt foram constantes e todos tinham peso igual. Os valores de *bootstrap* encontram-se indicados nos ramos da árvore e como

grupo externo utilizou-se a estirpe *Petaluma* (GenBank nº M25381). As figuras a seguir (12, 13, 14, 15 e 16) apresentam as árvores construídas pelos três métodos citados acima em diferentes formatações.

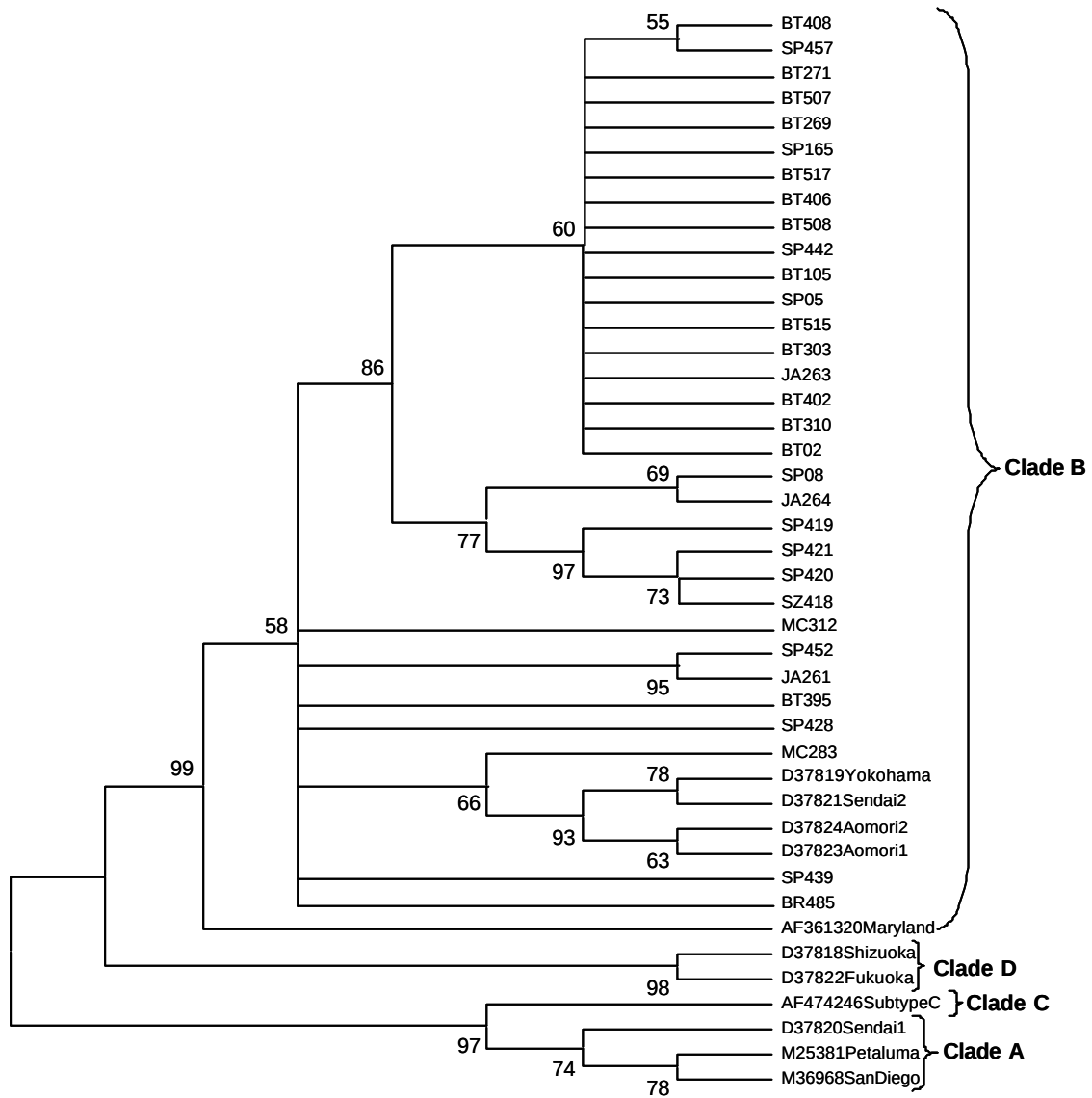


Figura 12- Árvore consenso construída pelo método de agrupamento de vizinhos obtida através das 32 amostras dos vírus da imunodeficiência felina estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26. Os números nos nós indicam o suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas

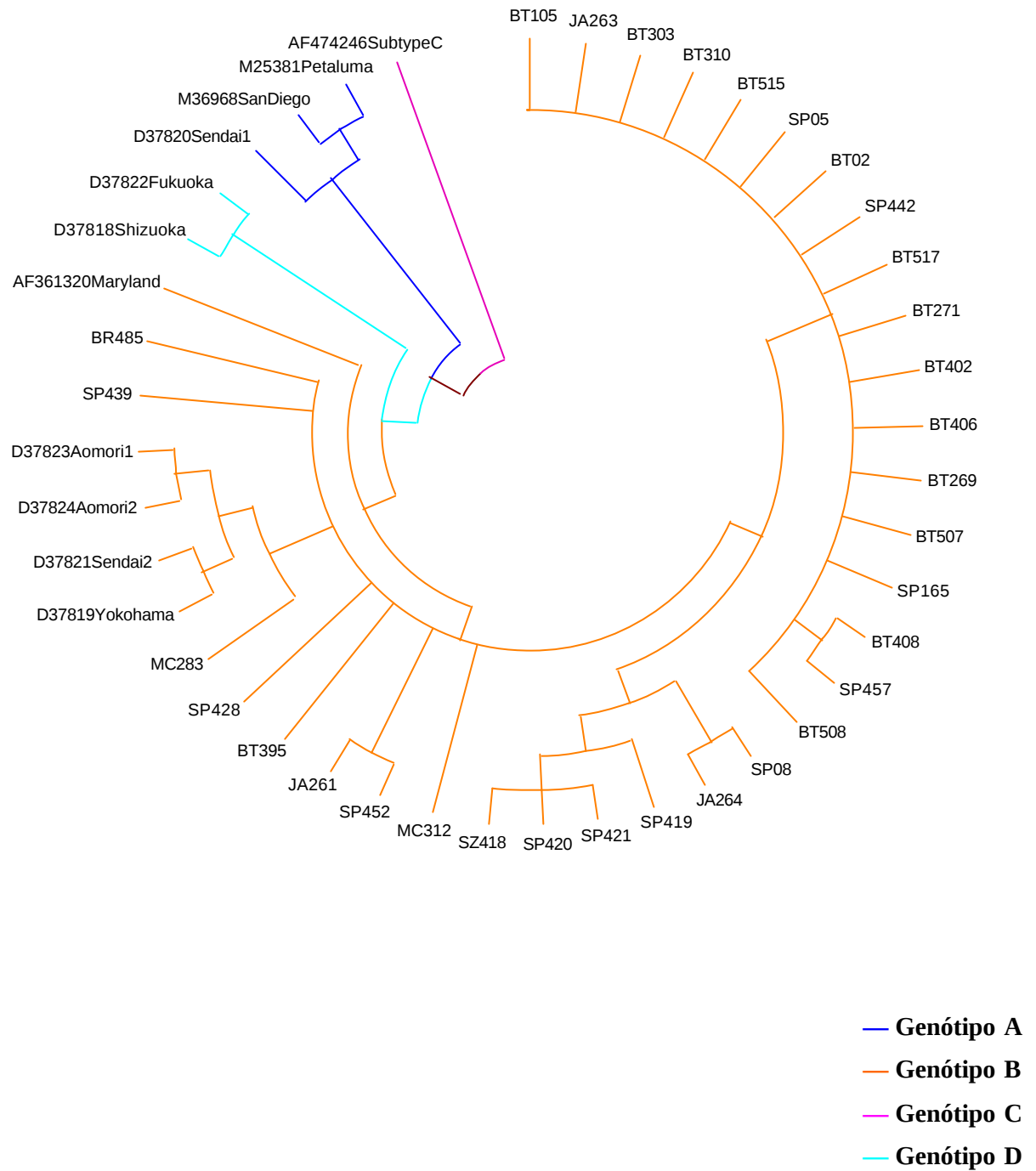


Figura 13- Árvore consenso construída pelo método de agrupamento de vizinhos obtida através das 32 amostras dos vírus da imunodeficiência felina estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26

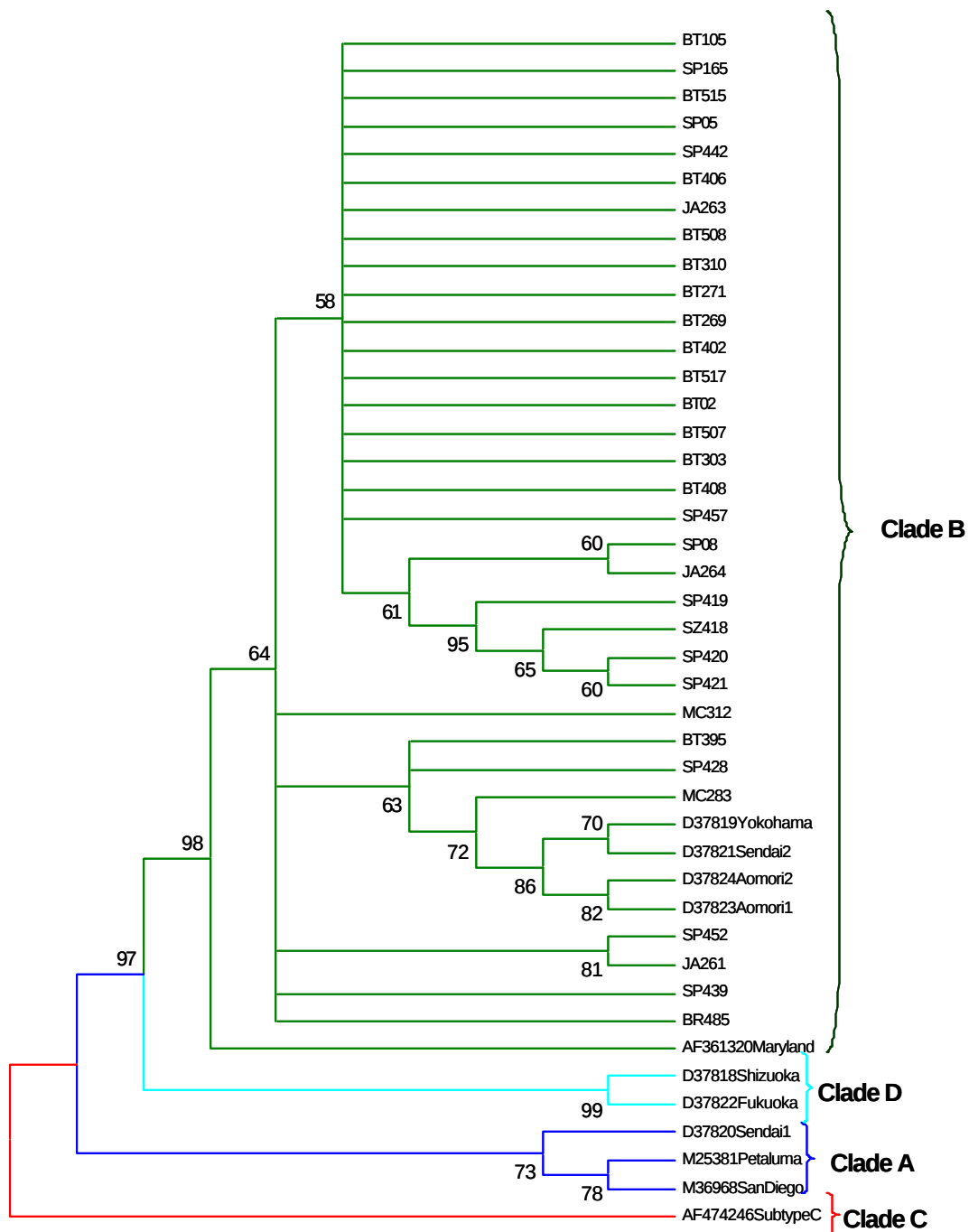


Figura 14- Árvore filogenética construída pelo método de evolução mínima obtida através das 32 amostras dos vírus da imunodeficiência felina estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26. Os números nos nós indicam o suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas

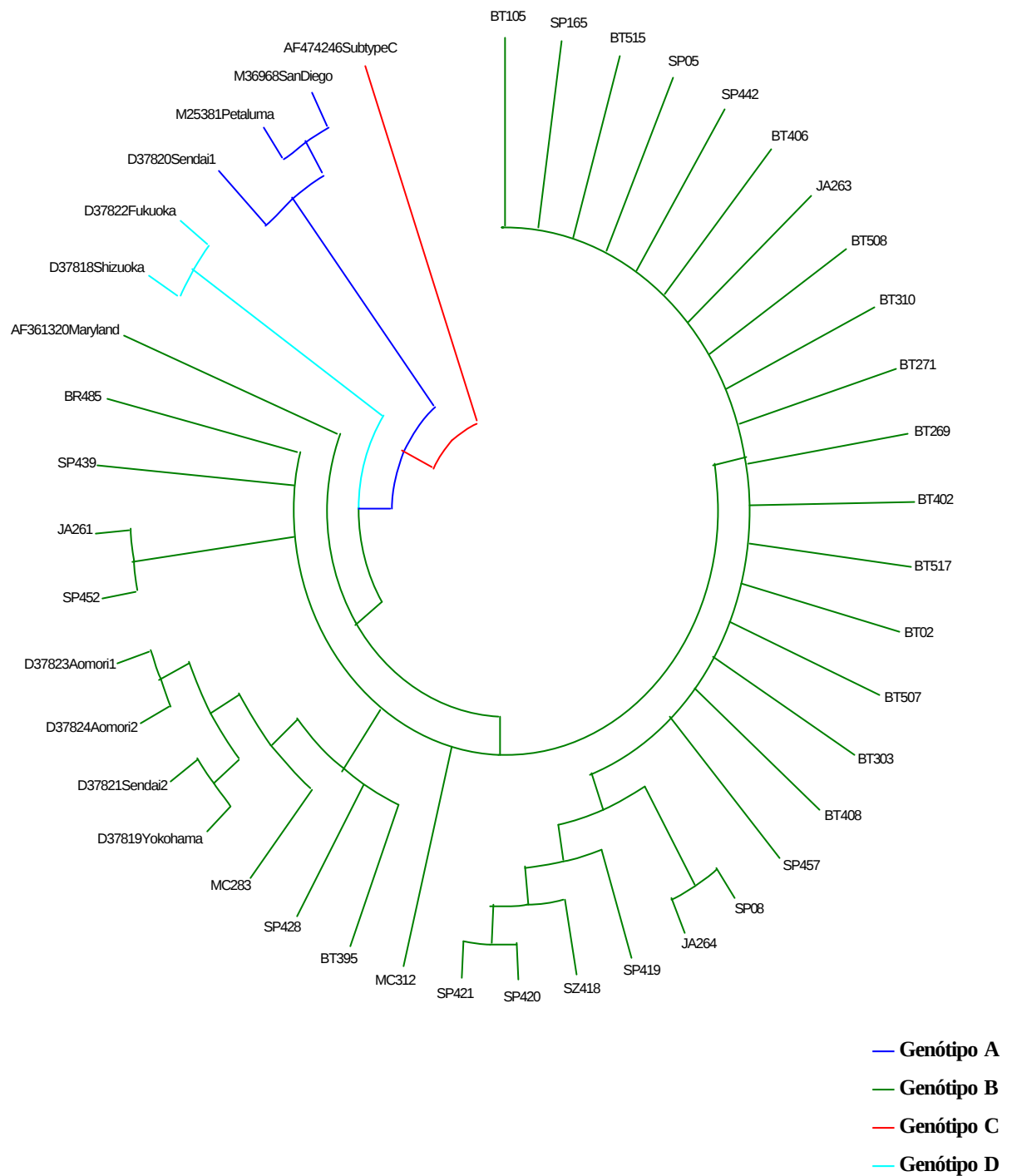
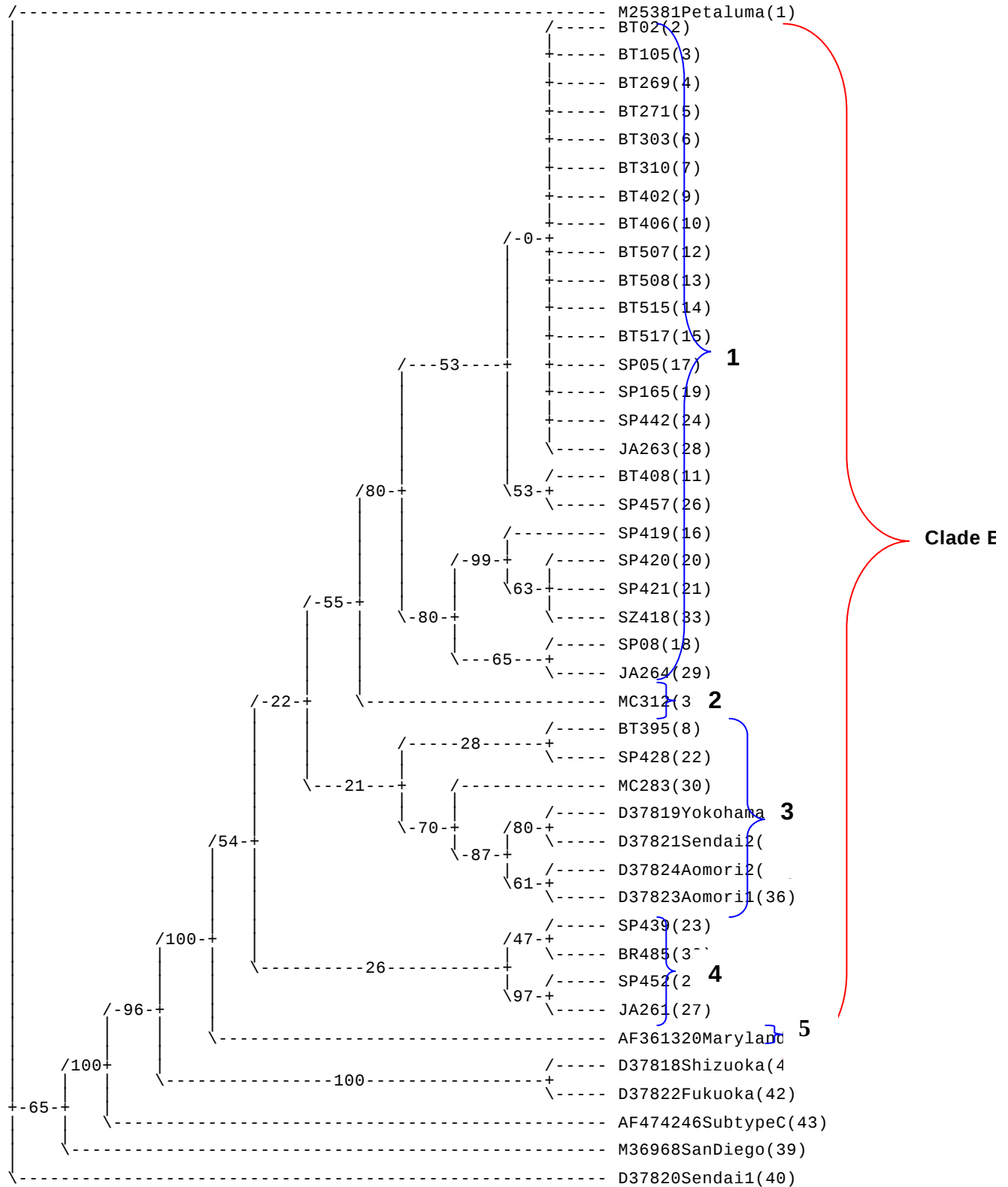


Figura 15- Árvore filogenética construída pelo método de evolução mínima obtida através das 32 amostras dos vírus da imunodeficiência felina estudadas, calculada utilizando o modelo de substituição nucleotídica proposto por Tamura Nei (1993) com distribuição gama de 0,26

Figura 16- Árvore filogenética construída pelo método da máxima parcimônia obtida através das seqüências de nucleotídeos do gene gag dos vírus da imunodeficiência felina, com os índices de *bootstrap*. As chaves de cor azul representam os subclades do genótipo B



4.9 – Mutações

Com respeito às mutações ocorridas nas 32 amostras positivas, verificou-se que na sequência de 459pb obtida pelo sequenciamento genético ocorreram 77 mutações (transversões + transições) e destas, apenas 18 resultaram em alteração de aminoácidos. É importante frisar que em 17 dessas amostras não ocorreu alteração de aminoácidos, apesar de terem sido observadas 28 mutações nas sequências de nucleotídeos das mesmas.

Ao confrontar as amostras entre si, averiguou-se desde nenhuma mutação, como por exemplo, entre as amostras BT402 e BT507, até 29, entre as amostras BT395 e SP457, com média de 11 mutações. Em relação às alterações de aminoácidos, apurou-se desde nenhuma, como era de se esperar para as amostras que não apresentaram diferenças na sequência de nucleotídeos, até 11 alterações entre as amostras SP452 e SP165, com média de apenas duas mutações.

A comparação entre as amostras BT395 e SP457 resultou em 29 mutações e destas, apenas três reverteram em alterações nos aminoácidos. Interessantemente, quando compararam-se as amostras estudadas com a estirpe Yokohama (D37819) verificou-se mutações em todas as 32 estudadas, com valores variando desde 10 (MC283) até 30 (SP165), e que em 17 delas não ocorreu alteração de aminoácidos, e nas que ocorreram, constatou-se de 1 a 7 alterações, sendo esta ocorrida com a amostra SP165.

A tabela 3 e 4 apresentam os valores obtidos através da avaliação das distâncias não corrigidas entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos das 32 amostras positivas estudadas filogeneticamente e a utilizada como referência do genótipo A do *vírus da imunodeficiência felina*, assim como utilizada como grupo externo.

Tabela 3- Matriz de distâncias não corrigidas entre as seqüências de nucleotídeos das 32 amostras estudadas dos *vírus da imunodeficiência felina* e a amostra de referência do genótipo A

Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2	1																						
3	1	2																					
4	1	2	2																				
5	2	3	3	3																			
6	16	17	17	17	18																		
7	9	10	10	10	10	23																	
8	8	9	9	9	9	22	1																
9	1	2	2	2	3	17	10	9															
10	4	5	5	5	6	18	7	6	5														
11	10	11	11	11	12	26	19	18	11	14													
12	17	18	18	18	19	11	24	23	18	19	27												
13	18	19	19	19	20	23	22	19	20	27	15												
14	1	2	2	2	3	17	10	9	2	5	11	18	18										
15	18	19	19	19	20	22	23	22	19	20	27	19	20	19									
16	13	14	14	14	13	29	20	19	14	17	22	26	25	14	29								
17	16	17	17	17	18	20	21	20	17	18	25	17	18	17	12	27							
18	2	3	3	3	4	18	11	10	3	6	12	19	20	3	20	15	18						
19	12	13	13	13	14	10	19	18	13	14	22	9	16	13	20	23	16	14					
20	8	9	9	9	10	12	15	14	9	10	18	13	18	9	20	19	18	10	8				
21	14	15	15	15	15	14	19	18	15	16	23	11	8	15	16	25	14	16	10	12			
22	10	11	11	11	11	24	1	2	11	8	20	25	24	11	24	21	22	12	20	16	20		
23	79	80	80	80	79	86	83	82	80	80	86	84	81	80	83	79	78	78	84	81	79	82	

Número 1- corresponde as amostras BT- 02, BT- 269, BT- 271, BT- 303, BT- 310, BT- 402, BT- 507, BT- 508, BT-517 (estas apresentam seqüências iguais); 2= BT-105, 3= BT-406; 4=BT-517; 5= 408; 6= BT-395; 7=SP- 420 e SP- 421 (seqüências iguais); 8= SP-419; 9=SP-05;10=SP-08 e SP-264 (seqüências iguais); 11= SP-165; 12= SP-428; 13= SP-439; 14= SP-442; 15=SP-452; 16=SP-457; 17=JÁ-261; 18=JÁ-263; 19=MC-283; 20=MC-312; 21=BR-485; 22=SZ-418; 23= M25381 Petaluma

Tabela 4 - Matriz de distâncias entre as seqüências de aminoácidos das 32 amostras estudadas dos *vírus da imunodeficiência felina* e a amostra de referência do genótipo A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2	1																						
3	0	1																					
4	1	2	1																				
5	1	2	1	2																			
6	1	2	1	2	2																		
7	3	4	3	4	3	4																	
8	2	3	2	3	2	3	1																
9	1	2	1	2	2	2	4	3															
10	0	1	0	1	1	1	3	2	1														
11	7	8	7	8	8	8	10	9	7	7													
12	0	1	0	1	1	1	3	2	1	0	7												
13	2	3	2	3	3	3	3	2	3	2	9	2											
14	0	1	0	1	1	1	3	2	1	0	7	0	2										
15	4	5	4	4	5	5	5	4	5	4	11	4	4	4									
16	2	3	2	3	3	3	3	2	3	2	9	2	2	2	4								
17	2	3	2	3	3	3	3	2	3	2	9	2	2	2	4	2							
18	0	1	0	1	1	1	3	2	1	0	7	0	2	0	4	2	2						
19	0	1	0	1	1	1	3	2	1	0	7	0	2	0	4	2	2	0					
20	0	1	0	1	1	1	3	2	1	0	7	0	2	0	4	2	2	0	0				
21	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	8	1	3	1	5	3	3	1	1	1			
22	3	4	3	4	3	4	0	1	4	3	10	3	3	3	5	3	3	3	3	3	2		
23	7	8	7	8	8	8	10	9	8	7	14	7	9	7	11	9	9	7	7	7	8	10	

Número 1- corresponde as amostras BT- 02, BT- 269, BT- 271, BT- 303, BT- 310, BT- 402, BT- 507, BT- 508, BT-517 (estas apresentam seqüências iguais); 2= BT-105, 3= BT-406; 4=BT-517; 5= 408; 6= BT-395; 7=SP- 420 e SP- 421 (seqüências iguais); 8= SP-419; 9=SP-05;10=SP-08 e SP-264 (seqüências iguais); 11= SP-165; 12= SP-428; 13= SP-439; 14= SP-442; 15=SP-452; 16=SP-457; 17=JÁ-261; 18=JÁ-263; 19=MC-283; 20=MC-312; 21=BR-485; 22=SZ-418; 23= M25381 Petaluma

*“Tempo, tempo, só tu nos gastas, nos
matas e, se poderes, nos renovas e nos
consolas também”.*

Irene Lisboa

Discussão

5- Discussão

A ocorrência da infecção pelo FIV já foi descrita em vários países. A situação epidemiológica aponta uma ampla frequência, com valores variando entre 1-52,7% (FRIEND et al., 1990; FURUYA et al., 1990; MORAILLON, 1990; BANDECCHI et al., 1992; BRALEY, 1994). Os resultados observados no presente trabalho demonstram uma frequência de infecção de 15,6% (81/519) que se apresentaram dentro do esperado e concorrente aos encontrados pelos autores supracitados.

De acordo com Hartmann (1998), a ampla variação encontrada na frequência da infecção é, principalmente, devido à condição fisiológica do animal estudado. Desta maneira, nossos dados só vem reforçar esta afirmação, visto que 55,5% (45/81) das amostras positivas foram de gatos considerados doentes. Na avaliação clínica dos gatos positivos observou-se quadro clínico compatível com os descritos por outros pesquisadores (LAPPIN, 1995; HARTMANN, 1998), porém não foi possível classificá-los em uma das quatro fases clínicas da doença proposta por Kyaw-Tanner & Robinson (1996), a não ser os animais positivos e assintomáticos, os quais podem ser classificados dentro da fase de latência da infecção.

Como observado nos resultados não foi possível classificar os animais com relação à idade, entretanto, os dados epidemiológicos de três gatos chamam a atenção devido à idade, ao grau de parentesco (irmãos) e pela positividade da mãe. Conforme a literatura, a maior incidência da doença ocorre nos animais com idade entre cinco a dez anos (YAMAMOTO et al., 1988; PERSECHINO et al., 1989). Outro aspecto importante descrito por Callanan et al. (1991), Wasmoen et al. (1992), Sellon et al. (1994) e O'Neil et al. (1996), é a possibilidade de transmissão vertical, que pode ocorrer por via uterina, durante o parto ou através do aleitamento materno. Confrontando os dados descritos e os citados pela literatura, há indícios da possibilidade de transmissão vertical, e deve-se salientar, também, que os outros dois gatos residentes na mesma casa e de outra origem materna foram negativos à infecção pelo FIV; reforçando ainda mais a possível transmissão vertical.

Observou-se uma frequência duas vezes superior nos machos em relação às fêmeas, mostrando-se um pouco inferior ao relatado em outros estudos, os quais demonstraram uma superioridade de três vezes em relação às fêmeas (YAMAMOTO et al., 1988; PERSECHINO et al., 1989). A explicação para esse maior número de machos infectados tem sido implicado ao seu comportamento (PEDERSEN et al., 1989;

YAMAMOTO et al., 1989). Vários estudos comportamentais já demonstraram que os gatos machos adultos apresentam uma agressividade maior que as fêmeas e brigam mais entre si, principalmente, pela demarcação de território, alimentos e acasalamento (DARDS, 1983; KERBY & MACDONALD, 1988; LIBERG & SANDELL, 1988; BRADSHAW & HALL, 1999). Deste modo, há predisposição à infecção pelo FIV, uma vez que o principal método de transmissão é a saliva contaminada (AYALA et al., 1998). Assim, pode-se considerá-los como animais com maior risco de infecção.

Ao realizar o teste de viabilidade das amostras foi possível demonstrar que alguns espécimes mantidos à temperatura de 8°C permaneceram viáveis por até três meses ressaltando que, com essa observação, após colheita do sangue total, não é necessário fazer a extração de DNA imediatamente. Entretanto, não se pôde prever o tempo máximo da viabilidade das amostras e também não foram encontrados dados de literatura referentes a este aspecto para serem confrontados.

Para a reação de seqüenciamento genético utilizaram-se fragmentos obtidos pela técnica de PCR, a qual amplificou 658pb do gene gag do FIV. Apesar de vários trabalhos terem sido baseados na seqüência do gene env para sorotipar e caracterizar geneticamente o FIV, utilizou-se, para este estudo, uma seqüência do gene gag. A escolha desse gene, baseou-se em sua maior conservação genética. Fato esse citado por Pistello et al. (1997), que através da comparação da proporção de substituições sinônimas e não-sinônimas em dois fragmentos, um do gene gag e outro do env, demonstraram uma maior conservação genética do gag. Outro aspecto em que se baseou a escolha do gene gag foi a possibilidade de sorotipagem através deste gene, pois de acordo com Hohdatsu et al. (1998) os genótipos baseados neste gene apresentam uma alta correlação com os genótipos ou clades baseados no gene env.

A seqüência de nucleotídeos do gene gag de 459pb obtidas no seqüenciamento genético mostrou-se bastante informativa para análise genealógica, para a sorotipagem e para a construção da árvore filogenética. Pistello e colaboradores (1997) analisaram um fragmento de nucleotídeos de 308pb do gene gag e conseguiram realizar com segurança a sorotipagem do FIV. Através desse estudo, os autores concluíram que mesmo utilizando uma seqüência curta de nucleotídeos é possível realizar a sorotipagem viral, desde que apresente dados informativos suficientes para isso, reforçando a necessidade de se escolher com critério o fragmento a ser seqüenciado.

Os estudos de sorotipagem do FIV já demonstraram uma ampla desigualdade na distribuição geográfica. Dentre os genótipos existentes, o A e o B são os mais freqüentemente

identificados em vários países da Europa, nos E.U.A. e no Japão (NISHIMURA et al., 1998; STEINRIGL & KLEIN, 2003). Neste trabalho, foi identificado um único genótipo em todas as amostras estudadas, o genótipo B. Esse achado corrobora com os encontrados por Duarte et al. (2002) que através da análise do gene gag, env e da região LTR identificaram em Portugal somente o genótipo B. Deve-se ressaltar que as amostras colhidas foram de animais residentes somente no estado de São Paulo e pode ser que a identificação de apenas um genótipo não reflita a realidade da população de felinos brasileiros, reforçando com isso a importância da realização de outros trabalhos desta magnitude. Entretanto, em resumo recentemente apresentado no Encontro Nacional de Virologia, Caxito et al. (2003), Minas Gerais, também encontraram apenas o genótipo B por estudos de RFLP do gene gag em nove amostras positivas para o FIV.

Nesse estudo, a busca pelo melhor modelo resultou na indicação do método proposto por Tamura Nei (1993). Esse modelo evolutivo considera que as taxas de transição entre as purinas (A e G) e entre as pirimidinas (C e T) são diferentes entre si e assume que há diferenças entre as taxas de transversão e transição. De acordo com Russo et al (2001), esse modelo é baseado no pressuposto de que todos os sítios evoluem a uma mesma taxa, o que raramente ocorre. Assim, foi proposto utilizar a distribuição gama como um método para corrigir essa falha. A correção gama apenas adiciona o parâmetro de variação de taxas no cálculo do número de substituições, ou seja, todos os sítios evoluem de acordo com uma determinada distribuição, mas as taxas de evolução variam de sítio para sítio.

Através do estudo das mutações ocorridas nas 32 amostras positivas estudadas, pôde-se inferir que a escolha do gene gag foi bastante adequada, uma vez que o número de mutações sinônimas observadas neste estudo foi maior que o já publicado para outros genes (PISTELLO et al., 1997; STEINRIGL & KLEIN, 2003), facilitando a análise filogenética. Isso é particularmente importante no que se refere ao gene env, em que a taxa de mutação é bastante elevada, resultando em variações que não refletem os vírus na população.

Na inferência filogenética utilizaram-se três metodologias, das quais duas são baseadas em matrizes de distâncias que são a evolução mínima (ME) e agrupamento de vizinhos ou neighbor-joining (NJ) e uma em estado de caráter, o método da máxima parcimônia.

As árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de evolução mínima e agrupamento de vizinhos apresentaram como resultado uma única árvore e com características

muito semelhantes, fato já esperado uma vez que o método de agrupamento de vizinhos foi criado a partir do método de evolução mínima.

Ressalta-se ainda, que em ambas as árvores obtidas através dos métodos de ME e NJ, todos os táxons analisados foram agrupados dentro do genotipo B, fato suportado pelos valores de *bootstrap* de 99% e 98%, respectivamente, observados nas figuras 12 e 14. O teste de *bootstrap*, desenvolvido por Felsenstein (1985), é usado para testar o grau de confiabilidade de árvores filogenéticas, ou seja, revela a consistência interna dos dados. De acordo com Nei & Kumar (2000), se o valor do *bootstrap* for igual ou superior a 95%, o arranjo é considerado como significantemente apoiado.

Durante a análise filogenética pelo método da máxima parcimônia, utilizou-se como grupo externo a estirpe viral do FIV identificada pelo nome Petaluma e com número de acesso no GenBank de M25381. Essa escolha foi baseada no reconhecimento mundial da mesma, por ser referência de estudo em várias pesquisas e por ser citada pelo sítio de taxonomia viral (www.virustaxonomyonline.com) como referência (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Ao comparar a árvore produzida pelo método da máxima parcimônia com as árvores dos métodos acima citados, observou-se uma topologia altamente concordante entre elas e, apesar de apresentarem aspectos metodológicos diferentes as 32 amostras estudadas também foram agrupadas dentro do clade B com um alto índice de *bootstrap* (100%). Dentro do clade B, vários subclades foram consistentemente observados (figura 16). De acordo com a disposição na topologia foram classificadas em 1 a 5. No subclade 1 foram agrupadas quase todas as amostras oriundas da cidade de Botucatu, a maioria das positivas de São Paulo, duas de Jaú e a única amostra da cidade de Suzano. A amostra, BT-395, a única que não foi classificada no subclade 1, apresentou uma extrema proximidade com a amostra SP-428.

As amostras (BT-395 e SP-428), também apresentaram intimidade com outra estirpe estudada, MC-283, procedente de Mogi das Cruzes e as três, dentro das 32 estudadas, foram agrupadas dentro do subclade 3, juntamente com as estirpes de FIV utilizadas como referência para o clade B; é importante ressaltar que entre as três, a MC-283, foi a que apresentou maior proximidade com as estirpes referências de B. Ao analisar os dados epidemiológicos da amostra BT-395 verificou-se que a mesma pertencia a um animal de origem desconhecida albergado em um criatório particular que recolhe animais errantes. Conseqüentemente, pode-se considerar a possibilidade de uma mesma origem ancestral entre

as três e delas com as amostras de referência, ademais, o animal pode ter sido infectado em qualquer uma destas cidades.

O subclade 4 foi composto pelas amostras SP-439, BR-485, SP-452 e JA-261, as quais apresentam origem geográfica diferentes entre si, com exceção das duas de São Paulo; contudo, os dados epidemiológicos são iguais aos da amostra BT-395, ou seja, origem primária desconhecida. Concluindo, apesar de terem sido colhidas em cidades diferentes, pode-se sugerir uma ancestralidade comum entre elas. Na árvore da máxima parcimônia, essa hipótese é suportada principalmente, entre as amostras SP-452 e JA-261 pelo valor de *bootstrap* encontrado de 97.

Curiosamente, a amostra, MC-312, de Mogi das Cruzes, não foi agrupada e nem apresentou proximidade com nenhuma outra estirpe estudada em nenhuma das três árvores obtidas, ou seja, não foi possível agrupá-la dentro de nenhum subclade. Assim, pode-se sugerir que MC-312 representa um protótipo de outro subclade.

A estirpe Maryland tornou-se importante à medida que, ao ser analisada, demonstrou uma maior diferença com as demais estudadas, uma vez que em nenhuma das topologias foi agrupada dentro dos subclades formados. Desta feita, pode-se inferir que a estirpe Maryland tem outro ancestral e apresenta maior grau de heterogeneidade em relação às outras amostras estudadas. Além disso, ao analisar as árvores construídas, o clade B pode ser dividido em dois subclades distintos. Um subclade maior formado pelas 32 amostras estudadas e mais as amostras utilizadas como referência do clade B no alinhamento genético e outro menor formado única e exclusivamente pela estirpe Maryland. A explicação provável para esta nítida separação observada é a origem geográfica das estirpes utilizadas como referência do clade B, visto que a Maryland foi isolada de amostra oriunda dos E.U.A. e as outras quatro são de origem japonesa.

Neste trabalho observa-se a primeira evidência que o genótipo B de FIV é predominante e altamente divergente no estado de São Paulo. As amostras estudadas e agrupadas dentro do clade B foram originárias de várias cidades paulistas. Além disso, estirpes de mesma origem geográfica foram agrupadas dentro de diferentes subclades, reforçando a divergência observada entre elas. Entretanto, são necessários mais estudos detalhados para poder determinar a prevalência da ocorrência dos genótipos de FIV em São Paulo e também no Brasil.

Como descrito na revisão de literatura, recentemente nos E.U.A. foi aprovada a comercialização de uma vacina com dois genótipos diferentes de FIV. Contudo, várias

publicações demonstraram a dificuldade em se produzir uma vacina eficaz contra todos os genótipos existentes, uma vez que não ocorre proteção entre os genótipos heterólogos (ELYAR et al., 1997). Adicionalmente, somente no Japão, Nishimura et al. (1998) demonstraram a ocorrência de quatro genótipos diferentes naquela população de gatos. Essa investigação reforça a sugestão feita por Steinrigl & Klein (2003) da necessidade de se conhecer a diversidade genética de cada país para poder produzir uma vacina eficaz em cada realidade, evitando assim possíveis falhas vacinais. No Brasil, através dos resultados deste trabalho, pode-se ainda sugerir a produção de uma vacina contendo somente as subclades do genótipo B mais freqüentes.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

Fernando Pessoa

Conclusões

6- Conclusões

- Na população de gatos domésticos estudada, a frequência de infecção pelo FIV foi de 15,6%. Nos machos este índice apresentou um valor superior às fêmeas e os animais clinicamente doentes também apresentaram maior ocorrência da infecção.
- Através das 32 amostras positivas estudadas foi realizada a genotipagem do FIV e assim, determinou-se a ocorrência de somente o genótipo B nas mesmas.
- As amostras estudadas apresentam a mesma origem ancestral com as estirpes oriundas do Japão.
- A sequência do gene gag estudada permitiu com segurança realizar a análise filogenética e também a classificação dos clades de FIV.

“A verdadeira felicidade provém de um sentimento de paz e contentamento que, por sua vez, tem que ser alcançado através do cultivo do altruísmo, do amor, da compaixão e da eliminação da cobiça e do egoísmo”.

Tenzin Gyatso, o XIV Dalai-Lama.

Referências Bibliográficas

7- Referências Bibliográficas¹

- ACKLEY, C.D. et al. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus, *J. Virol.*, v. 64: p. 5652-5. 1990.
- AMEISEN, J. C. Programmed cell death (apoptosis) and AIDS pathogenesis. *J. Acquir. Immune Defic., Syndr. Res. Hum. Retroviruses.*, v. 10: p.3-5, 1994.
- AYALA, I. et al. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida del gato causado por el F.I.V (Feline Immunodeficiency Virus). *Arch. Méd. Vet.*, v. 30: p. 1-12, 1998.
- BACHMANN, M.H. et al. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J. Virol.*, v. 71: p. 4241-53, 1997.
- BANDECCHI, P. et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 31: p. 337-45, 1992.
- BARLOUGH, J.E. et al. Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. *J. Acquired. Immune. Defic. Syndr.*, v. 4: p. 219-27, 1991.
- BEEBE, A. M. et al. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J. Virol.*, v. 68: p. 3080-91, 1994.
- BENDINELLI, M. et al. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8: p. 87-112, 1995.
- BIGORNIA, L. et al. Construction and in vitro characterization of attenuated feline immunodeficiency virus long terminal repeat mutant viruses. *J. Virol.*, v. 75: p. 1054-60, 2001.
- BISHOP, S. A. Functional abnormalities in the human immune system of FIV-infected cats. In: WILLETT, B. J.; JARRET, O. (Eds). **Feline Immunology and Immunodeficiency**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 150-69.
- BISHOP, S. A. et al. Programed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Clin. Exp. Immunol.*, v. 93: p. 65-71, 1993.

1- De acordo com as Normas para publicações da Unesp. São Paulo: Editora Unesp, 1994. 4v., v.2: Referências bibliográficas.

- BOARI, A. et al. Infezione da feline immuno-deficiency virus (FIV): indagine sieropidemiologica nella provincia di Bologna. *Nuovo Progresso Vet.* v. 47: p. 538-40, 1992.
- BRADSHAW, J. W. S.; HALL, L. S. Affiliative behaviour of related and unrelated pairs of cats in catteries: a preliminary report. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v. 63: p. 251-55, 1999.
- BRALEY, J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline Practice.*, v. 2: p. 25-8, 1994.
- BRUNER, D.; PEDERSEN, N. C. Infection of peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.*, v. 63: p. 5483-8, 1989.
- CALDAS, A. P. F. et al. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de Reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20: p. 20-5, 2000.
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R (Ed). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.51-63.
- CALLANAN, J. J. et al. Transmission of feline immunodeficiency virus from mother to kitten. *Vet. Rec.*, v. 128: p. 332-3, 1991.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.129-143.
- CAMPBELL, R. S. F.; ROBINSON, W. F. The comparative pathology of the lentiviruses. *J. Comp. Path.*, v. 119: p. 333-95, 1998.
- CANEY, S. M. A et al. Expression of chemokine receptors in the feline reproductive tract and large intestine. *J. Comp. Path.*, v. 126: p. 289-302, 2002.
- CAXITO, F. A. et al. Study of feline immunodeficiency virus (FIV) in Minas Gerais by nested-PCR-RFLP analysis of the *gag* gene. In: XIV NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 8, 2003, Florianópolis. Anais.....Florianópolis: Santa Catarina, 2003. p.209.
- CHOI, I. S. et al. Anti-feline immunodeficiency virus (FIV) soluble factor(s) produced from antigen-stimulated feline CD8(+) T lymphocytes suppresses FIV replication. *J. Virol.*, v. 74: p. 676-83, 2000.
- CLERICI, M. et al. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Clin. Invest.*, v. 84: p. 1892-9, 1989.
- DANAVE, I. R. et al. Feline immunodeficiency virus decreases cell-comunication and mitochondrial membrane potential. *J. Virol.*, v. 68: p. 6745-50, 1994.

- DARDS, J. L. The behaviour of dockyard cats: interactions of adult males. *Appl. Anim. Ethol.*, v. 10: p. 133-53, 1983.
- DAWSON, S. et al. Effect of primary-stage feline immunodeficiency virus on subsequent feline calicivirus vaccination and challenge in cats. *AIDS*, v. 5: p. 747-50, 1991.
- DEAN, G. A. et al. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocytes subsets of blood and lymph-node. *J. Virol.*, v. 70: p. 5165-9, 1996.
- DE PARSEVAL, A. et al. Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J. Virol.*, v. 71: p. 5742-9, 1997.
- DIEHL, L. J. et al. Longitudinal assesment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a quantitative competitive reverse transcriptase PCR. *J. Virol.*, v. 69: p. 2328-32, 1995.
- DOW, S. W. et al. Feline immunodeficiency virus: a neurotropic lentivirus. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.*, v. 3: p. 658-68, 1990.
- DUA, N. et al. The primary stage of experimentally-induced feline immunodeficiency virus infection: clinical, hematologic, and virologic features. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 43: p. 337-55, 1994.
- DUARTE, A. et al. Phylogenetic analysis of five portuguese strains of FIV. *Arch. Virol.*, v. 147: p. 1061-70, 2002.
- EFRON, B. Bootstrapping methods: another look at the jackknife. *Ann. Stat.*, v. 7: p. 1-26, 1979.
- EGBERINK, H. F. et al. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53: p. 1133-8, 1992.
- EGBERINK, H. F. et al. Bicyclams, selective antagonists of the human chemokine receptor CXCR4, potently inhibit feline immunodeficiency virus replication. *J. Virol.*, v. 73: p. 6346-52, 1999.
- EHRNST, A. et al. HIV in pregnant women and their offspring: evidence for late transmission. *Lancet*. v. 338: p. 203-7, 1991.
- ELYAR, J. et al. Perspectives on FIV vaccine development. *Vaccine*, v. 15: p. 1437-44, 1997.
- ENGLISH, R. V, TOMKINS, M. B. Effect of FIV infection on the peripheral immune system. In: WILLETT, B. J.; JARRET, O. (Eds). **Feline Immunology and Immundeficiency**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 131-49.

- FELSENSTEIN, J. Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.*, v. 27: p. 401-10, 1978.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.*, v. 39: p. 783-91, 1985.
- FLYNN, J. N. et al. Suppression of feline immunodeficiency virus replication in vitro by a soluble factor secreted by CD8⁺ T lymphocytes. *Immunology*, v. 96: p. 220-9. 1999.
- FRIEND, S. C. et al. Feline immunodeficiency virus: prevalence, disease associations and isolation. *Aust. Vet. J.*, v. 67: p. 237-43, 1990.
- FURUYA, T. et al. Existence of feline immunodeficiency virus infection in japanese cat population since 1968. *Jap. J. Vet. Sc.*, v. 52: p. 891-3, 1990.
- GENTILE, G. et al. Infecção por el virus de la inmunodeficiencia felina: estudio seroepidemiológico y clínico em Bologna (Itália). *Arch. Med. Vet.*, v. 28: p. 153-6, 1996.
- GEORGE, J. W.; PEDERSEN, N. C. Hematologic and lymphocyte subset changes during the first 11 months of infection with FIV: a study of 61 cats (Abstr). *1° Intern. Conf. of Fel. Immuno. Virus Res*, Davis, USA, 4-7 de Setembro de 1991, p. 21.
- GEORGE, J. W. et al. The effect of age on the course of experimental feline immunodeficiency virus infection in cats. *J. Acquir. Immun. Syndr. Res. Hum. Retroviruses.*, v. 9: p. 897-905, 1993.
- GRAUR, D.; LI, W. H. F. **Fundamentals of molecular evolution**. 2. ed. Sunderland, Massachuseter; 2000. 443 p.
- GREENE, W. K. et al. Nucleotide sequences of Australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. *Arch: Virol.*, v. 132: p. 369-79, 1993.
- GRINDEM, C. B. et al. Seroepidemiologic survey of feline immunodeficiency virus infection in cats of Wake County, North Carolina. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194: p. 226-9, 1989.
- GRUFFYDD-JONES, T. J. et al. Serological evidence of feline immunodeficiency virus infection in UK cats from 1975-1976. *Vet. Rec.*, v. 123: p. 569-70, 1988.
- HAGIWARA, M. K. et al. Feline immunodeficiency virus infection in cats from Sao Paulo, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 30: p. 217-20, 1993.
- HARTMANN, K et al. Diagnostik der FIV-infektion. *Tierärztliche Praxis*, v. 22: p. 268-72, 1994.

- HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency virus infection: na overview. *Vet. J.*, v. 155: p. 123-37, 1998.
- HOFFMANN-FEZER, G. et al. Decline in CD4⁺ cell numbers in cats with naturally acquirde feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.*, v. 66: p. 1484-8, 1992.
- HOHDATSU, T. et al. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism analysis of the *gag* gene. *J. Virol. Methods.*, v. 70: p. 107-11, 1998.
- HOSIE, M. J. et al. A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J. Virol.*, v. 67: p. 1667-71, 1993.
- HOSIE, M. J. The development of a vaccine against feline immunodeficiency virus. *Br. Vet. J.*, v. 150: p. 25-39, 1994.
- HOSIE, M. J. et al. Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccine. *J. Virol.*, v. 69: p. 1253-5, 1995.
- HOSIE, M. J.; FLYNN, J. N. Feline immunodeficiency virus vaccination: characterization of the immune correlates of protection. *J. Virol.*, v. 70: p. 7561-8, 1996.
- HOSIE, M. J. et al. Modulation of feline immunodeficiency virus infection by stromal cell-derived factor. *J. Virol.*, v. 72: p. 2097-104, 1998a.
- HOSIE, M. J. et al. DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies. *J. Virol.*, v. 72: p. 7310-9, 1998b.
- HUELSENBECK, J. P.; RANNALA, B. Phylogenetic methods come of age: testing hypothesis in an evolucionary context. *Science*. v. 276: p. 227-32, 1997.
- INADA, G et al. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus isolated from cats in Taiwan. *Arch. Virol.*, v. 142: p. 1459-67, 1997.
- ISHIDA, T. et al. Clinical and immunological staging of feline immunodeficiency virus (FIV) infection. In: SCHELLEKENS, H.; HORZINEK, M.C. (Eds). **Animal Models in AIDS**. Amesterdam, Elsevier, 1990. p. 189-99.
- JARRET, O. et al. Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 199: p. 1362-4, 1991.
- JOAG, S. V. et al. Lentivirus. In: FIELDS, D.M.; KNIPE, P. M. et al. (Eds). **Virology: Lentiviruses**. Philadelphia: Raven, 1996. p. 1977-96.

- JORDAN, H. L. et al. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). *J. Virol.*, v. 69: p. 7328-33, 1995.
- JORDAN, H. L. et al. Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. *J. Virol.*, v. 70: p. 8224-8, 1996.
- KAKINUMA, S. et al. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. *J. Virol.*, v. 69: p. 3639-46, 1995.
- KERBY, G.; MACDONALD, D. W. Cat society and the consequences of colony size. In: TURNER, D. C.; BATESON, P. (Eds) **The domestic cat**. 5. ed., Cambridge: Cambridge University Press; 1988, p. 67-81.
- KUBY, J. The immune system in AIDS. In: KUBY, J. (Eds). **Immunology**. 3. ed., Freeman, W. H. and Company, New York, 1997. p. 523-54.
- KUMAR, S. et al. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0 Pennsylvania State University Park and Arizona State University, Tempe, 2000.
- KYAW-TANNER, M. T. et al. The induction of in vivo superinfection and recombination using feline immunodeficiency virus as the model. *Arch. Virol.*, v. 138: p. 261-71, 1994.
- KYAW-TANNER, M. T.; ROBINSON, W. F. Quasispecies and naturally occurring superinfection in feline immunodeficiency virus infection. *Arch. Virol.*, v. 141: p. 1703-13, 1996.
- LAPPIN, M. R. Opportunistic infection associated with retroviral infections in cat. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal)*, v. 10: p. 244-50, 1995.
- LAWRENCE, C. E. et al. Cytokine production by cats infected with feline immunodeficiency virus: a longitudinal study. *Immunology.*, v. 85: p. 568-74, 1995.
- 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. *J. Virol.*, v. 74: p. 1854-63, 2000.
- LIANG, Y et al. T cells overexpressing interferon-gamma and interleukin-10 are found in both the thymus and secondary lymphoid tissues of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Infect. Dis.*, v. 181: p. 564-75, 2000.
- LIBERG, O.; SANDELL, M. Spatial organization and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In: TURNER, D. C.; BATESON, P. (Eds) **The domestic cat**. 5. ed., Cambridge: Cambridge University Press; 1988, p. 83-98.
- LOCKRIDGE, K. M. et al. Protective immunity against feline immunodeficiency virus induced by inoculation with vif-deleted proviral DNA. *Virology*, v. 273: p. 67-79, 2000.

- LUTZ, H. et al. FIV vaccine studies: I. Immune response to recombinant FIV env gene products and outcome after challenge infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 46: p. 103-13, 1995.
- MAKI, N. et al. Molecular characterization and heterogeneity of feline immunodeficiency virus isolates. *Arch. Virol.*, v. 123: p. 29-45, 1992.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto, 2001. p. 97-107.
- MOENCH, T. R. et al. 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: p. 797-802, 1993.
- MORAILLON, A. Feline immunodepressive retrovirus infections in France. *Vet. Rec.*, v. 126: p. 68-9, 1990.
- MUSE, S. V. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant. Mol. Biol.*, v. 42: p. 25-43, 2000.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press: New York, 2000. 333 p.
- NISHIMURA, Y. et al. Genetic heterogeneity of env gene of feline immunodeficiency virus obtained from multiple districts in Japan. *Virus Res.*, v. 57: p. 101-12, 1998.
- O'CONNOR, T. P. et al. Development and evaluation of immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (Feline immunodeficiency virus). *J. Clin. Microbiol.*, v. 27: p. 474-9, 1989.
- OHNO, K. et al. Induction of apoptosis in T lymphoblastoid cell line infected with feline immunodeficiency virus. *Arch. Virol.*, v. 135: p. 153-8, 1994.
- O'NEIL, S. A. et al. Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. *J. Virol.*, v. 70: p. 2894-901, 1996.
- PANCINO, G. et al. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virol.*, v. 192: p. 659-62, 1993.
- PECORARO, M. R. et al. Genetic diversity of Argentina isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v. 77: p. 2031-5, 1996.
- PEDERSEN, N. C. et al. Isolation of a T-Lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, v. 235: p. 790-3, 1987.
- PEDERSEN, N. C. et al. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 21: p. 111-29, 1989.

- PERI, E. et al. Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern Italy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 40: p. 285-97, 1994.
- PERSECHINO, A. et al. Infezione da lentivirus della immunodeficienza nel gatto. Inchiesta sieropidemiologica in Campania, *Acta Méd. Vet.*, v. 35: p. 397-404, 1989.
- PISTELLO, M. et al. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of the Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. *J. Gen. Virol.*, v. 78: p. 2247-57, 1997.
- POESCHLA, E. M.; LOONEY, D. J. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: Heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. *J. Virol.*, v. 72: p. 6858-66, 1998.
- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Appl. Notes*, v. 14: p. 817-8, 1998.
- PU, R. et al. Dual-subtype FIV vaccine protects cats against in vivo swarms of both homologous and heterologous subtype FIV isolates. *AIDS*, v. 15: p. 1-13, 2001.
- RECHE JUNIOR, A. et al. Estudo clínico da síndrome de imunodeficiência adquirida em gatos domésticos de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Sci.*, v. 34: p. 152-5, 1997.
- RICHARDSON, J. et al. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by primary and laboratory-adapted strains of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.*, v. 73: p. 3661-71, 1999.
- RIGBY, M. A. et al. Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus; molecular epidemiology and evidence of selection for change. *J. Gen. Virol.*, v. 74: p. 425-36, 1993.
- REUBEL, G. H. et al. Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v. 7: p. 1013-5, 1994.
- RIMMELZWAAN, G. F. et al. Gag and env-specific antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Vet. Microbiol.*, v. 39: p. 153-65, 1994.
- RUSSO, C. A. M.; MIYAKI, C. Y.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, 2001. p. 108-16.
- RZHETSKY, A.; NEI, M. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 9: p. 945-67, 1992.
- SABINE, M. et al. Feline AIDS. *Aust. Vet. Pract.*, v. 18: p. 105-7, 1988.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 6: p. 406-25, 1987.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: Um guia prático**. Bragança: Pará, 2003. 124 p.
- SELLON, R. K. et al. Feline immunodeficiency virus can be experimentally transmitted via milk during acute maternal infection. *J. Virol.*, v. 68: p. 3380-5, 1994.
- SHELTON, G. H. et al. Chronic leukopenia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194: p. 253-5, 1989.
- SODORA, D. L. et al. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) *env* gene subtypes and comparison of the Fiv and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *J. Virol.*, v. 68: p. 2230-38, 1994.
- SPARGER, E. E. Current thoughts on feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v. 23: 173-91, 1993.
- STEINRIGL, A.; KLEIN, D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *J. Gen. Virol.*, v. 84: 1301-7, 2003.
- SWOFFORD, D. L. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 10: 512-26, 1993.
- THOMPSON, J. D. et al. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.*, v. 24: p. 4876-82, 1997.
- TORTEN, M. et al. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.*, v. 65: p. 2225-30, 1991.
- UHL, E. W. et al. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 90: p. 113-32, 2002.
- VAN REGENMORTEL, M H. V. et al. Virus Taxonomy: an update. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2000. Disponível em: <<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll/?f=templates&fn=document-fra>> Acesso em 31/03/2004.

- WASMOEN, T. et al. Transmission of feline immunodeficiency virus from infected queens to kittens. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 35: p. 83-93, 1992.
- WILLET, B. J. et al. Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology.*, v. 81: p. 228-33, 1994.
- WILLET, B. J. et al. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. *J. Virol.*, v. 71: p. 6407-15, 1997.
- YAMAMOTO, J. K. et al. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49: p. 1246-58, 1988b.
- YAMAMOTO, J. K. et al. Feline immunodeficiency syndrome. A comparison between feline T-lymphotropic lentivirus and feline leukemia virus, *Leukemia*, v. S: p. 204-15, 1988a.
- YAMAMOTO, J. K. et al. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 194: p. 213-20, 1989.