

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUANTIFICAÇÃO VIRAL E SEQÜENCIAMENTO DO GENE DA  
TRANSCRIPTASE REVERSA EM GATOS NATURALMENTE  
INFECTADOS COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA  
TRATADOS COM AZT**

ANDREZA SORIANO FIGUEIREDO

BOTUCATU – SP

Junho 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUANTIFICAÇÃO VIRAL E SEQUENCIAMENTO DO GENE DA  
TRANSCRIPTASE REVERSA EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS  
COM O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA TRATADOS COM AZT.**

**ANDREZA SORIANO FIGUEIREDO**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária para obtenção  
de título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Ass. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

BOTUCATU – SP

Junho 2007

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*

Figueiredo, Andreza Soriano.

Quantificação viral e sequenciamento do gene da transcriptase reversa em gatos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência felina tratados com AZT / Andreza Soriano Figueiredo. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

Orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Assunto CAPES: 50502034

1. Gato - Doenças - Tratamento    2. Vírus (Doença)

CDD 636.80896

Palavras-chave: AZT;Quantificação relativa; Resistência; Sequenciamento; Transcriptase reversa; Vírus da imunodeficiência felina

FIGUEIREDO, A.S., Paparotto, T.; Taniwaki, S.A., Augusti, A., Araújo Jr., J.P. Quantificação viral e sequenciamento do gene da transcriptase reversa e gatos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência felina tratados com AZT. Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

## **Resumo**

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é um lentivírus que causa uma síndrome de imunodeficiência em gatos domésticos. O FIV tem sido particularmente utilizado em estudos de resistência viral aos análogos de nucleosídeos devido a Transcriptase Reversa (TR) apresentar propriedades físicas, catalíticas e sensibilidade às drogas semelhantes à TR do HIV. Os objetivos desse trabalho foram tratar com AZT gatos naturalmente infectados com o FIV, fazer o monitoramento da carga viral e DNA proviral por PCR em tempo real e monitoramento genético por sequenciamento. Dos 12 animais infectados, 6 receberam o AZT na dose de 10mg/kg/dia e 6 receberam placebo. Durante 96 dias de tratamento, o plasma e sangue destes animais foram analisado com relação à carga viral e concentração relativa de DNA proviral utilizando-se a técnica de quantificação relativa por PCR em tempo real com SYBR Green, desenvolvida por nossa equipe. Além disso, foi realizado o sequenciamento genético da região que codifica a TR de 3 dos animais. Foi realizada com sucesso a padronização da PCR em tempo real para quantificação relativa do FIV. Não houve diferença estatisticamente significativa da carga viral ou do DNA proviral entre os grupos tratado e controle. O sequenciamento genético revelou a presença de lisina na posição 41 do sítio ativo da TR. A presença deste aminoácido confere até 4 vezes menor sensibilidade ao AZT em mutantes do HIV. Por possuir alta estabilidade genética, supomos que os vírus dos demais animais não sequenciados possuem também a 41-lisina. A presença da 41-lisina pode ser uma das possíveis explicações para a falha do tratamento com AZT. Outra hipótese é a de que a dose fornecida não foi adequada.

Palavras-chave: AZT; Quantificação relativa; Resistência; Sequenciamento; Transcriptase reversa; Vírus da imunodeficiência felina.

FIGUEIREDO, A.S., Paparotto, T.; Taniwaki, S.A., Augusti, A., Araújo Jr., J.P. Viral Quantification and sequencing of the reverse transcriptase gene of Feline Immunodeficiency Virus in naturally infected cats treated with AZT. Botucatu. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

## **Abstract**

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a lentivirus which causes a progressive disruption of the host's immune functions. FIV has been particularly used as a model for studies in retroviral resistance to nucleoside analogs because its similarities in physical properties, catalytic and sensitivity in comparison with HIV/RT. The aims of this work were to treat cats naturally infected with FIV, quantify viral load and proviral DNA by real time quantitative PCR with SYBR Green and analyze the viral nucleotide sequence. From 12 animals naturally infected, 6 received AZT at a dose of 10mg/kg/day and 6 received placebo. During 96 days of treatment, viral load and concentration of proviral DNA were measured by relative quantitative real time PCR developed by our staff. The nucleotide sequence of the RT encoding region was also achieved for 3 animals. The real time PCR relative quantification was successfully standardized for FIV. There was no significant statistical difference between treated and control groups. The nucleotide sequence revealed a lysine at position 41 on the enzyme active site. This lysine confers 4-fold decreased sensitivity to AZT in HIV RT-mutants. FIV subtype B has high genetic stability and we purposed that the other virus not sequenced have the same amino acid and hypothesized that this mutations can be one of the reasons determining the failure of the treatment. The other hypothesis is that the dose was not adequate.

Key words: AZT; Feline Immunodeficiency Virus, Genetic sequence; Relative quantification; Resistance; Reverse transcriptase.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Número de amostras de sangue total e origem	20
TABELA 2.	Média dos valores de Ct das quantificações por PCR em Tempo Real anteriores ao tratamento.	22
TABELA 3.	Seqüência dos “primers” direcionados ao gene “pol”.	25
TABELA 4.	Pares de primers utilizados para amplificação do gene “pol”.	26
TABELA 5.	Lista das temperaturas de anelamento utilizadas para os diferentes pares de primers na amplificação do gene “pol”.	27
TABELA 6-	Número, origem e sinal clínico mais evidente no momento do diagnóstico dos 12 animais selecionados para o experimento.	30
TABELA 7.	Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do DNA do animal 5 utilizados para curva FIV.	31
TABELA 8.	Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do DNA do animal 5 utilizados para curva GAPDH.	33
TABELA 9.	Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do cDNA de Poliovírus.	34
TABELA 10.	Valores relativos de FIV obtidos calculados pelo programa SDS 1.2.3 (Applied Biosystems).	36
TABELA 11.	Valores de P ente grupos tratado e controle em cada momento.	36
TABELA 12.	Valores relativos de FIV, normalizados com Poliovírus, obtidos pelo programa SDS 1.2.3 (Applied Biosystems).	38
TABELA 13.	Valores de P entre grupos tratado e controle em cada momento.	38
TABELA 14.	Valores de FIV normalizados com GAPDH obtidos pelo programa DAS 1.2.3 (Applied Biosystems).	40
TABELA 15.	Valores de P entre grupos tratado e controle em cada momento.	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do genoma do vírus da imunodeficiência felina com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR para o gene “pol”.	26
FIGURA 2.	Representação gráfica da curva padrão do FIV, com pontos desde puro a 1:8.	32
FIGURA 3.	Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para o FIV desde puro a 1:8.	32
FIGURA 4.	Representação gráfica da curva padrão do GAPDH.	33
FIGURA 5.	Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para GAPDH desde puro a 1:8.	34
FIGURA 6.	Representação gráfica da curva padrão do Poliovírus.	35
FIGURA 7.	Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para Poliovírus desde puro a 1:1000.	35
FIGURA 8	Representação gráfica dos valores de FIV.	37
FIGURA 9.	Representação gráfica das medianas dos valores de FIV, de cada grupo, normalizados com Poliovírus.	39
FIGURA 10.	Representação gráfica das medianas dos valores de FIV, de cada grupo, normalizados com GAPDH.	41
FIGURA 11.	Alinhamento das seqüências de aminoácidos correspondente a TR do FIV dos animais e do FIV TM2. Pontos representam aminoácidos iguais e traços representam regiões em que não foram seqüenciados os nucleotídeos	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ml= mililitro

µl = microlitro

µg = micrograma

ng = nanograma

3TC = (-)-β-2',3'-Didesoxi-3'-Tiacitidina

AZT = 3'-azido-3'-desoxitimidina

Ct = *threshold cycle*

ddI = 2',3'-didesoxinosina

ddC = 2',3'-Didesoxicidina

d4T = 2',3'-Didesoxi-2',3'-Didehidrotimidina ΔCt = delta Ct

FDA = *US Food and Drug Administration*

FIV = Vírus da Imunodeficiência Felina

GAPDH = *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*

HAART = *Highly Active Antiretroviral Therapy*

LUX = *Light Upon Extension*

Nested-PCR = reação em cadeia pela polimerase interna

PCR = reação em cadeia pela plimerase

pb = pares de bases

PP<sub>i</sub> = pirofosfato

Qr = quantificação relativa

SDS = *sequence detection system*

TCID<sub>50</sub> = *tissue culture infectious dose 50*

T<sub>m</sub> = *melting temperature*

Vero = células de rim de macaco verde africano

## 1. Introdução

Em 1987, Pedersen et al., (1987) isolaram pela primeira vez um vírus T-linfotrópico com características de um lentivírus em gatos domésticos na Califórnia. Por causar uma síndrome de imunodeficiência em gatos e por apresentar propriedades físicas e biológicas semelhantes ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) o vírus foi nomeado como Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) (Hartmann et al., 1998).

O FIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* possuindo 105-125nm de diâmetro, nucleocapsídeo cônico circundado por um envelope de forma esférica a elipsóide (Pedersen et al., 1987). O ácido nucléico é constituído por duas moléculas de RNA não complementares, idênticas, com 9,4 kilobases. Possui os genes “gag”, “pol” e “env” e outros adicionais que codificam proteínas estruturais e não estruturais.

Por intermédio da glicoproteína de superfície, o vírion interage com um receptor específico da célula hospedeira e penetra no citoplasma por fusão com a membrana plasmática. No citoplasma por ação da Transcriptase reversa (TR), o RNA viral é transcrito para uma fita dupla de DNA com bases adicionadas nas extremidades 5’ e 3’ denominadas de “Long Terminal Repeats” (LTRs), que contém as informações para a iniciação e terminação da transcrição. A fita dupla de DNA, por ação da Integrase (IN), é integrada ao genoma celular, sendo denominada de DNA proviral ou provírus (Myiazawa et al., 2002). O restante da replicação é totalmente dependente da maquinaria sintética da célula hospedeira. A montagem viral envolve a interação da proteína precursora transcrita do gene “gag” com o genoma e com a membrana celular. Após a montagem e brotamento ocorre um processamento proteolítico pela ação da Protease (PR) viral individualizando cada proteína o que torna o vírus infectivo (Lin et al., 2000).

As estirpes de FIV isoladas de gatos domésticos são classificadas dentro de cinco subtipos, designados em A, B, C, D e E por comparação da sequência de 684 nucleotídeos compreendidos na região entre V3 e V5 do gene “env” (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995). No Brasil só foi encontrado o FIV subtipo B (Caxito et al., 2003; Lara et al. 2006).

A prevalência de FIV no Brasil varia de 2,7% a 37,5% (Hagiwara et al.; 1993; Caldas et al., 2000; Souza et al., 2002; Taniwaki et al., 2002; Caxito et al., 2003). Lara et al., (2006), demonstraram a ocorrência de 15,6% no Estado de São Paulo.

O curso da doença é caracterizado por uma primeira fase curta com sinais clínicos inespecíficos, seguida por uma fase assintomática de curso variável, culminando em uma fase terminal com complicações associadas a uma severa imunodeficiência (Pedersen et al., 1987).

Devido ao curso clínico longo, com manifestações clínicas inespecíficas e alterações progressivas e silenciosas da doença, o diagnóstico não pode ser determinado apenas pelos sinais clínicos. Indiretamente pode-se determinar a presença viral com testes de detecção de anticorpos circulantes utilizando, principalmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), que está disponível em kits comerciais. Diretamente, o vírus pode ser identificado pela reação de polimerase em cadeia que detecta o DNA proviral (Caldas et al., 2000). Além de ser uma prova de alta sensibilidade e especificidade analítica, o DNA proviral pode ser detectado em linfócitos de sangue periférico na primeira semana de infecção (Matteucci et al., 1993).

Em muitos gatos naturalmente infectados o FIV não causa uma doença clínica severa. Tomados os devidos cuidados, os gatos podem viver anos com boa qualidade de vida. Contudo, a quimioterapia anti FIV tem sido uma área de grande investigação não somente para beneficiar os gatos, mas também pelo potencial benefício aos pacientes HIV positivos (Hartman & Sellon, 2006). Muitas drogas antivirais desenvolvidas para o HIV podem ser usadas para o FIV devido à semelhança entre as enzimas transcriptase reversa de ambos os vírus em relação a propriedades físicas, atividade catalítica e susceptibilidade às drogas aprovadas para o tratamento contra a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Cronn et al., 1992)

A utilização de análogos de nucleosídeos como 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) sozinho ou em conjunto com outras drogas, tem sido amplamente estudada *in vivo* e *in vitro* (Hartmann et al., 1992; Bisset et al., 2002). O tratamento com AZT beneficia os gatos por promover a redução da carga viral plasmática, melhorar o status imunológico e clínico, melhorar a qualidade de vida e aumentar a longevidade (Hartmann & Sellon, 2006).

Infelizmente, o uso prolongado do AZT é limitado devido à seleção de variantes virais resistentes que podem apresentar até 200 vezes menor sensibilidade à droga determinando a falha do tratamento (Arion et al., 2000).

Muitas drogas não são liberadas para a venda comercial, sendo inacessíveis aos veterinários mesmo quando demonstram boa eficácia contra o FIV. Conseqüentemente, é limitado o número de drogas disponíveis para gatos (Hartman & Sellon, 2006).

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de estudos que avaliassem a eficiência do tratamento assistido com AZT em gatos naturalmente infectados com FIV subtipo B. O fato de ocorrer alta variabilidade genética entre os vírus pode comprometer a eficácia do tratamento. Assim, trabalhos realizados com gatos naturalmente infectados com subtipo encontrado no Brasil são inéditos e trarão aplicações imediatas em nosso meio. O detalhamento inédito das mutações de resistência ao AZT, e a quantificação da carga viral serão de grande ajuda para o estabelecimento de estratégias terapêuticas. Além disso, podem contribuir para a liberação do uso veterinário das drogas antiretrovirais, oferecendo uma alternativa ao sacrifício de animais e protegendo os proprietários contra zoonoses, uma vez que animais em estágio avançado da doença apresentam profunda imunossupressão ficando susceptíveis a doenças.

## 2. Revisão de literatura

A técnica de PCR em tempo real tem sido cada vez mais utilizada por apresentar vantagens bastante atrativas. Entre as vantagens incluem-se rapidez das reações, análise de amplificações na fase exponencial, redução do risco de contaminação do ambiente e preços cada vez mais acessíveis (Gunson et al., 2006). Empregada tanto para diagnóstico quanto para pesquisa, a técnica permite o delineamento da cinética de proliferação viral. A quantificação de determinada seqüência por PCR em tempo real baseia-se na contínua medição do aumento ou redução de sinais de fluorescência durante a reação de amplificação. Existe um limitado número de kits comerciais para detecção viral (Watzinger et al., 2006). Em 2004, Gibellini et al. desenvolveram o método de quantificação do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) utilizando o SYBR Green como corante fluorescente, demonstrando 100% de especificidade e alta sensibilidade com limite de detecção igual a 50cópias/ml.

A quantificação do gene alvo pode ser feita com o emprego da quantificação absoluta ou relativa (Livak & Schmittgen, 2001). A quantificação absoluta fornece o exato número de cópias do ácido nucléico alvo em uma amostra necessitando a produção de um DNA padrão para se obter esse resultado, o qual é calculado pela curva padrão (Giulietti et al., 2001). Em estudos objetivando a determinação da carga viral, a quantificação absoluta é muito utilizada, possuindo como principal vantagem o fato de trabalhar com unidades, que favorecem a compreensão e comparação de um resultado por vários profissionais (Watzinger et al., 2006). Como o DNA padrão freqüentemente é conseguido com clonagem em plasmídeos, ele pode ser produzido em grande quantidade, o que possibilita o seu uso durante longos períodos e facilita a adoção de um DNA como padrão em vários estudos. Entretanto, a eficiência de reação obtida de amostras biológicas pode ser totalmente diferente da obtida com uso do DNA plasmidial. Dessa forma, a quantificação fica comprometida. Além disso, o custo para a sua produção é mais elevado e também são necessários muitos cuidados durante a sua manipulação para se evitar problemas de contaminação do laboratório.

A quantificação relativa descreve as mudanças na expressão de um gene alvo relativa a uma amostra de referência (Livak & Scmittgen, 2001), sendo um procedimento mais simples de ser executado, com menor custo e que, de acordo com os objetivos de um estudo, fornece um resultado mais próximo das condições do experimento, uma vez que todas as comparações são realizadas com base em uma amostra de referência utilizada no próprio experimento. Para o cálculo da concentração relativa do gene alvo podem ser adotados os métodos de curva padrão ou comparativo de Ct (“threshold cycle”) (Livak & Scmittgen, 2001), porém, esses resultados não serão expressos em unidades, como ocorre na quantificação absoluta (Watzinger et al., 2006).

A técnica de PCR em tempo real também tem sido utilizada para a detecção e quantificação do FIV (Leutenegger et al., 1999; Bisset et al., 2001).

Como todo retrovírus, o FIV integra o genoma viral ao genoma do hospedeiro durante o ciclo replicativo. A enzima responsável pela conversão do RNA fita simples em DNA fita dupla é a Transcriptase reversa (TR) (Hartman et al. 1998). Durante a o processo de transcrição reversa ocorre a polimerização tanto RNA-dependente quanto DNA-dependente (Amacker et al. 1995). O produto final ou provírus possui bases adicionadas nas extremidades 3’ e 5’ denominadas de “Long Teminal Repeats” (LTR) que são necessárias para a integração ao genoma hospedeiro realizada pela enzima Integrase e também contém sítios de ligação para proteínas reguladoras dos genes que controlam a expresssão dos genes virais (Myiazawa et al. 2002).

A TR do FIV consiste de dois polipeptídeos, a subunidade 66-kDa (p66) e a 51-kDa (p51), presentes em quantidades equimolares (North et al., 1990 22 do Amacker 1995). A p51 é gerada pela clivagem do domínio RNase H (p15) da porção C-terminal da p66 pela enzima viral Protease (Amacker et al., 1995). A p51 possui a mesma seqüência de nucleotídeos mas adota conformação diferente. Segundo Amacker et al., (1995), ambas subunidades são enzimaticamente ativas.

A comparação entre as seqüências da TR do HIV e do FIV (subtipo A) revelou 63% de identidade de nucleotídeos, 48% de identidade e 67% similaridade de aminoácidos (Amacker 1995). Apesar dessa homologia parcial, a TR do FIV apresenta atividade catalítica e propriedades físicas semelhantes (North et al. 1990; Amacker et al. 1995) e, por isso, o FIV representa um importante modelo experimental para pesquisa na área de

quimioterapia antiretroviral que utiliza drogas inibidoras da TR. Em conjunto com inibidores da Protease, drogas inibidoras da TR são os principais componentes da “Highly Active Antiretroviral Therapy” (HAART) que reduziu drasticamente a mortalidade de pessoas com HIV/AIDS. A TR do FIV é sensível a várias drogas antiretrovirais utilizadas para o HIV, entretanto, não existe inibidor da Protease eficiente para o FIV o que impossibilita a utilização da terapia HAART (Kervinen et al. 1998).

Entre as drogas antiretrovirais utilizadas para o HIV o análogo de nucleosídeo 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT-Zidovudine-Azidotimidina-Retrovir<sup>R</sup> GlaxoSmithKline) foi a primeira droga aprovada pela “US Food and Drug Administration” (FDA).

O AZT é uma timina modificada que contém um grupo azida no lugar da hidroxila na posição 3' do açúcar desoxirribose. O AZT compete com nucleotídeos trifosfatos naturais pelo sítio ativo (N) de ligação a nucleotídeos da TR. Uma vez ligado, o AZT pode ser incorporado à seqüência de nucleotídeos durante a transcrição reversa. A ausência do grupo hidroxila na posição 3' impossibilita a ligação do grupo fosfato 5' do próximo nucleotídeo a ser incorporado, o que bloqueia a síntese de DNA (terminador de cadeia) (El Safadi et al., 2007). A taxa de incorporação e a afinidade do AZT são similares aos nucleotídeos naturais (Reardon et al., 1992). As concentrações intracelulares do AZT são baixas se comparadas aos nucleotídeos naturais (Becher et al., 2002), entretanto, é um potente inibidor da transcrição reversa porque a incorporação de apenas um AZT durante a polimerização do DNA proviral é, em princípio, suficiente para bloquear o processo (El Safadi et al., 2007).

O AZT tem sido utilizado para o FIV em pesquisas *in vivo* (Hartman et al., 1992, Smith et al., 1994; Arai et al. 2002), *in vitro* (Bisset et al., 2002) e também no tratamento de gatos naturalmente infectados (Hartman et al., 1998). Informações a respeito do uso clínico e dosagens são variadas e contraditórias (Zhang et al., 2004). Tratamento em gatos naturalmente infectados em uma dosagem de 5mg/kg/12h por via subcutânea durante 3 semanas promoveu melhora da estomatite, conjuntivite, alopecia e do estado imunológico (aumento da razão CD4/CD8) (Hartman et al., 1992). A melhora das condições clínicas dos gatos aumentou a qualidade de vida e longevidade (Zhang et al., 2004). Entretanto, Smith et al. (1994) observaram que as doses 0,2, 1, 5, 25, ou 50mg/kg/24h por via subcutânea em gatos experimentalmente infectados apresentaram menor efeito do que o esperado. Doses superiores causariam efeitos tóxicos nos animais.

Arai et al. (2002) demonstraram que a administração de AZT e/ou Lamivudina (3TC) em gatos experimentalmente infectados (cronicamente) na dose de 40mg/kg/dia/droga provocou anemia média a severa e febre com 2-3 semanas de tratamento. Diminuindo-se a dose para 20mg/kg/dia/droga os animais apresentaram flutuações ou nenhuma diminuição da temperatura por mais uma semana. Com doses de 10mg/kg/dia/droga alguns animais apresentaram diminuição para temperatura normal enquanto outros só atingiram temperaturas normais uma semana depois de cessado o tratamento. Com relação à carga viral, título de anticorpos e razão CD4/CD8 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado e controle

As discrepâncias entre resultados traduzem a dificuldade na experimentação com o FIV. Os experimentos utilizam diferentes vias de administração das drogas, diferentes tipos virais para infecção experimental e ainda diferentes quantidades de inoculo. As pesquisas com gatos naturalmente infectados enfrentam ainda a grande diversidade de variantes virais que aparecem naturalmente durante a infecção por retrovírus.

O rápido aparecimento de mutações é devido à baixa fidelidade da enzima TR por não possuir atividade de “proofreading” (Preston et al., 1988), à alta taxa de replicação do vírus (Perelson et al. 1996) e alta taxa de recombinações da TR (Kellam & Larder, 1995). Entretanto, a baixa fidelidade da TR também é essencial para a eficiente incorporação de nucleosídeos modificados (El Safadi et al., 2007). Logo após a aprovação do AZT para o uso clínico em pacientes HIV positivos foi detectada a diminuição da sensibilidade à droga depois de monoterapia por período maior que 6 meses (Larder et al. 1989).

Em 1989, Larder & Kemp apresentaram os primeiros resultados sobre as mutações no HIV que conferem resistência ao AZT. Por comparação de seqüências de nucleotídeos do gene da TR do HIV-1 de indivíduos sensíveis e resistentes ao AZT, estes pesquisadores encontraram que 4 mutações, D67N, K70R, T215F/Y e K219Q estavam presentes nos indivíduos mais resistentes. Indivíduos com apenas 3 das mutações também eram altamente resistentes, o que levou os pesquisadores à hipótese de que poderia haver mutações ainda não identificadas. Assim, em 1992, Kellam et al. demonstraram a quinta mutação envolvida na resistência como sendo M41L da TR do HIV. A presença de somente a M41L leva a um decréscimo de 4 vezes na sensibilidade enquanto que em conjunto com D67N, K70R e T215F/Y diminui 179 vezes a inibição.

Os pesquisadores tentaram elucidar a evolução do surgimento das mutações quantificando as proporções de mutações ao longo de vários ciclos replicativos *in vitro*. Harrigan et al. (1998), encontraram que a mutação K70R é a mais prevalente em uma população viral o que está consistente com a observação de que esta mutação é, geralmente, a primeira substituição selecionada após o início da terapia com AZT (Boucher et al., 1992). É interessante notar que após serem adicionados separadamente ao ensaio, variantes com as mutações M41L e T215Y se associaram. Estes variantes demonstraram capacidade de replicação mais eficiente do que os variantes com cada mutação individualmente (Harrigan et al. 1998).

Por outro lado, Sheehy e Desseberger, (1993), encontraram as mutações comumente relacionadas à resistência ao AZT apenas em 4 de 7 amostras analisadas, enquanto que em 3 isolados resistentes não havia nenhuma das mutações mas outras, sugerindo o envolvimento de mais fatores ainda não elucidados no processo de resistência desenvolvido durante o tratamento com anitretrovirais.

Remington et al. (1994) demonstraram, *in vitro*, reversão rápida de variantes resistentes ao AZT para variantes não resistentes após a retirada da droga. Na ausência da droga os variantes sensíveis apresentaram maior capacidade de replicação do que os resistentes. A resistência demonstrada pelos variantes foi justificada pela análise da seqüência de aminoácidos que revelou a mutação Q202K. Essa mudança resultou na alteração de carga negativa para positiva nessa posição, o que modifica substancialmente a conformação da proteína levando à resistência. É de grande importância esse achado porque essa mutação não é comumente relatada nos casos de resistência ao AZT (Larder & Kemp, 1989; Kellam et al., 1992). Um fato ainda mais intrigante foi o achado de que, analisadas isoladamente, ambas proteínas TR dos variantes resistentes e dos que reverteram o fenótipo apresentaram resistência ao AZT e possuíam a mutação Q202K. Os pesquisadores sugeriram que podem haver mutações em outros locais fora da região codificadora da TR que influenciam na presença ou ausência de resistência.

Existe ainda a possibilidade de que indivíduos ainda não tratados possuam variantes virais com fenótipo de resistência. A prevalência de mutações que conferem resistência a inibidores da TR nos Estados Unidos foi de 6% no período de 1993 a 1998 em pacientes

não tratados (Weinstock et al., 2000). Na Espanha, a prevalência encontrada foi de 5,4% entre 1996 a 2003 (Eiros et al. 2004).

Para o FIV foram demonstrados variantes virais resistentes para as drogas antiretrovirais 2',3'-Didesoxinosina (ddI) (Gobert et al. 1996), 2',3'-Didesoxicitidina (ddC) (Medlin et al. 1996), 2',3'-Didesoxi-2',3'-Didehidrotimidina (d4T) (Zhu et al. 1996), para a combinação AZT e (-)- $\beta$ -2',3'-Didesoxi-3'-Tiacitidina (3TC) foi encontrada a mutação de P156S (Smith et al. 1998). O primeiro lentivírus mutante com fenótipo de resistência a drogas a ser identificado *in vitro* foi o vírus da imunodeficiência felina resistente ao AZT (Remington et al. 1991), entretanto, não houve caracterização genética.

Arion et al., (1999), propuseram um mecanismo para o fenótipo de alta resistência ao AZT quando a TR do HIV apresenta as mutações D67N, K70R, T215F e K219Q. As mutações D67N/K70R conferem aumento da sensibilidade ao pirofosfato (PP<sub>i</sub>). O PP<sub>i</sub> é comumente encontrado nas células e é produto da síntese de DNA. O PP<sub>i</sub> realiza a reação inversa a polimerização (pirofosforólise) rompendo a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos adjacentes. Se o último nucleotídeo adicionado for o AZT, a reação resulta na retirada do terminador de cadeia deixando um grupo 3'-hidroxila livre para a ligação de um novo nucleotídeo. Já as mutações T215F/K219Q promovem um aumento do tempo em que o AZT permanece ligado à TR. O mecanismo primário de resistência é a pirofosforólise facilitada pelo tempo de permanência maior do nucleotídeo modificado. Além disso, as mutações T215F/K219Q promovem um aumento da capacidade da enzima em polimerizar, sendo este mecanismo compensatório para a elevada taxa de pirofosforólise desencadeada pela mutação D67N/K70R. Não se sabe a contribuição da mutação M41L, se houver, nestes mecanismos citados.

Variantes virais resistentes, toxicidade da droga e limitado acesso a novos compostos antiretrovirais e até mesmo ao AZT no Brasil, determinam a contínua busca por respostas e novos caminhos contra os retrovírus.

### **3. Objetivos**

Realizar tratamento antiretroviral com AZT em gatos naturalmente infectados pelo FIV subtipo B.

Padronizar e aplicar a PCR em tempo real para determinar a concentração viral relativa do FIV a partir de soro colhido ao longo do tratamento com AZT.

Padronizar a aplicar a PCR em tempo real para determinar a concentração do DNA proviral do FIV a partir de sangue total colhido ao longo do tratamento com AZT.

Caracterização genômica de vírus por meio do seqüenciamento do gene da transcriptase reversa para pesquisa de possíveis mutantes resistentes.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Delineamento experimental

O experimento pode ser dividido em três fases: na primeira foi realizada a busca por animais positivos para o FIV com a utilização da técnica de Nested-PCR. A segunda fase constituiu-se da padronização tanto das etapas que antecedem as técnicas de sequenciamento e PCR em Tempo Real quanto das mesmas. Por fim, os animais positivos para o FIV receberam tratamento antiviral com AZT por 96 dias, foram monitorados quanto à carga viral, além disso, foram obtidas as seqüências de nucleotídeos correspondentes à região codificadora da enzima transcriptase reversa.

### 4.2 Colheita de amostras sanguíneas

As amostras de sangue total foram colhidas utilizando seringa descartável de 3 mL através de punção da veia jugular e colocadas em tubos estéreis contendo anticoagulante.

Foram contactados gatis particulares e instituições de proteção aos animais nas cidades de Botucatu, Piracicaba e Sorocaba-SP, de março/2005 a agosto/2006. Foram colhidas amostras de sangue total de 202 animais que são demonstradas na Tabela 1 quanto a sua cidade de origem.

NUMERO DE AMOSTRAS	ORIGEM
139	BOTUCATU
49	PIRACICABA
14	SOROCABA

TABELA 1- Número de amostras de sangue total e origem.

### 4.3 Identificação de animais positivos

#### 4.3.1 Extração do DNA

O DNA pró-viral foi extraído diretamente do sangue dos animais utilizando-se GFX Genomic Blood DNA Purification Kit<sup>®</sup>(Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.3.2 Nested-PCR para o gene “gag”

Foram utilizados quatro “primers”: 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' e FIV NESTED-S - 5' TAT TCA AAC AGT AAA TGG AG 3'.

Para realização do nested-PCR do gene “gag” foi utilizada a metodologia proposta por Hohdatsu et al. (1998), com algumas modificações.

Foram realizadas duas reações, sendo que na primeira utilizou-se os “primers” FIV PCR A2 e FIV PCR S2 e o DNA extraído do sangue do animal e na segunda, os “primers” 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 Taq DNA polimerase (Biotools), 2,5 de tampão de PCR 10X (Biotools), um µL 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 MgCl<sub>2</sub> (50mM/L, Biotools), 0,25µL de dNTPs (10mM, Invitrogen), e cinco µL do DNA extraído da amostra de sangue do animal na primeira reação e dois µL 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 6 min, após prévio aquecimento da tampa por 2 min, para as desnaturações, seguida de uma seqüência 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.

O controle-negativo da reação consistiu de água ultrapura estéril. Como controle-positivo, foi utilizada uma amostra de DNA de animal positivo no diagnóstico de rotina do laboratório.

### **4.3.3 Análise dos produtos de PCR**

Os produtos obtidos na amplificação pela técnica de Nested-PCR 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 100pb (Promega), com auxílio de transiluminador UV. Foram considerados positivos os animais cujos DNAs, após realização da técnica de Nested- PCR, resultaram em fragmentos de 329pb.

### **4.4 Animais positivos**

Doze animais (7 fêmeas e 5 machos) positivos foram utilizados durante o experimento. Esses animais também foram testados quanto à presença de co-infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV).

Com o consentimento dos responsáveis, os animais foram recolhidos e abrigados em alojamento adaptado para gatos.

### **4.5 Tratamento antiviral**

Os 12 animais positivos foram divididos em dois grupos de 6 animais estabelecidos com base na carga viral de cada animal independentemente da presença de sinais clínicos. De acordo com os valores de Ct, cada dois animais apresentaram valores médios próximos e então qualquer um dos dois poderia ser colocado em cada grupo, como pode ser visto na Tabela 2.

Grupo Tratado		Grupo Controle	
Animal	Média de Ct	Animal	Média de Ct
T1	26,3	C1	28,1
T2	29,05	C2	30,1
T3	30,8	C3	30,7
T4	31,7	C4	31,7
T5	32,2	C5	32,4
T6	*35,9	C6	34,1

TABELA 2 – Média dos valores de Ct das quantificações por PCR em Tempo Real anteriores ao tratamento. \*Este valor não representa a média de Ct uma vez que não foi possível detectar o FIV na primeira quantificação

O AZT foi gentilmente cedido pelo Instituto Bio-Manguinhos (FIOCRUZ).

O grupo tratado recebeu a droga antiviral AZT por via oral na dose de 10mg/kg/dia SID. A droga era ajustada de acordo com o ganho ou perda de peso dos animais e administrada sob suspensão em leite. O grupo controle recebia a mesma quantidade de leite.

Todos os animais foram monitorados ao longo do experimento para o surgimento de reações adversas.

#### 4.5.1 Coleta e processamento das amostras

Amostras de sangue (1mL/animal) foram coletadas semanalmente durante o primeiro mês do experimento e depois a cada duas semanas. O sangue era colocado em tubos com anticoagulante para utilização tanto para o acompanhamento hematológico dos animais quanto para obtenção de DNA e RNA viral.

O plasma foi separado do sangue por centrifugação a 3.000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. A extração de RNA foi realizada com o E.Z.N.A. Viral RNA Isolation kit (Omega Bio-tek) seguindo recomendações do fabricante. Imediatamente antes da extração do RNA eram adicionados 1000TCID<sub>50</sub> de Poliovírus tipo 1 .

Imediatamente após a extração era realizada a obtenção de cDNA com a enzima Improm RT II (Promega) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Como iniciador

da reação de transcrição reversa foi utilizado o “Random Primer” (hexâmeros ao acaso) na concentração de 250 ng/20µl.

A extração de DNA foi realizada com GFX Genomic Blood DNA Purification Kit<sup>®</sup> (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### **4.6 PCR em Tempo Real**

As reações de PCR em tempo Real foram realizadas para quantificação o FIV antes, durante e após tratamento com AZT. Foram utilizados tanto o DNA quanto o RNA, respectivamente, para análise da quantidade de células hospedeiras com genoma viral integrado e a quantidade de vírus circulante nos animais.

Foram utilizados os “primers” FivSYBRs 5'- AAA CAG TAA ATG GAG CAC CAC AGT AT- 3' e FivSYBRas 5'- TAG CCC CTC TCT TGC CTT CTC- 3' desenhados ([www.IDTDNA.com](http://www.IDTDNA.com)) com base na seqüência de nucleotídeos do gene “gag” obtida do sequenciamento das amostras virais dos animais positivos. A reação foi realizada com o uso do kit SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante, nas seguintes condições: 95°C/1 minuto, 40 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/1 minuto e uma etapa final para curva de dissociação de 95°C/15 segundos, 60°C/30 segundos e 95 °C/15 segundos (7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems). Os sinais de fluorescência foram adquiridos nos passos de extensão do ciclo de amplificação. Todas as amostras foram processadas em triplicata.

##### **4.6.1 Normalizadores**

Como controle interno das reações foram utilizadas as amplificações do gene da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) felina e Poliovírus tipo 1. Para tanto, foram empregados os “primers” GAPDHs 5'-GCC GTG GAA TTT GCC GT-3', GAPDHs 5'-GCC ATC AAT GAC CCC TTC AT-3', POLIOs 5'-TGG GTG CTC AGG TTT CAT CAC AGA-3' e POLIOas 5'-TCC TGT TTC GAA GCC GCG TTA CTA-3'.

Cada amostra de DNA foi processada em triplicata para o FIV e para o GAPDH e cada amostra de RNA era processada em triplicata para o FIV e para o Poliovírus.

#### **4.6.2 Determinação da concentração relativa do FIV**

Para a quantificação do FIV tanto nas amostras de DNA quanto nas de RNA utilizou-se a curva padrão calculada com quatro pontos.

Quantificação de DNA: a curva padrão para o FIV foi construída a partir da diluição do DNA do animal C2 por ter apresentado valores de “threshold cycle” (Ct) entre 26 e 29 e reprodutibilidade. Para a curva do GAPDH foi utilizada uma mistura de DNA dos animais.

Quantificação de RNA: a curva padrão para o FIV foi construída utilizando a mesma amostra de DNA do animal C2 e para o Poliovírus foi utilizado cDNA produzido a partir de RNA extraído de cultivo celular, Ct variando de 13 a 23.

A menor diluição do DNA e do cDNA das curvas recebeu o valor relativo igual a 100 e, seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições foram determinadas como 50, 25 e 12,5. A quantidade de vírus nas amostras foi expressa em relação às curvas padrão que foram adicionadas em cada ensaio, sendo os valores fornecidos diretamente pelo programa SDS 1.2.3 (Applied Biosystems).

#### **4.7 Seqüenciamento do gene “pol”**

O seqüenciamento do gene “pol” foi realizado para o FIV de todos os animais positivos antes, durante e depois do tratamento com AZT.

##### **4.7.1 Amplificações**

Foram construídos “primers” direcionados ao gene “pol” com base na seqüência D37819 Yokohama obtida a partir do Genbank, utilizando-se o programa Primer Express (Applied Biosystems). Na Tabela 3 podem ser visualizadas as seqüências de “primers”.

PRIMER	SEQUENCIA
Fpol37s	5' AAC CAT TAT Tag gAA gAg A 3'
Fpol247s	5' ACC CgA ATA ATC CTT ggA ATA C 3'
Fpol569s	5'-GTA AAA AAG AAC ATA AAC-3'
Fpol963s	5' TCA ATA AgA gAA Tgg ACT gTA g 3'
Fpol1410s	5' gCA gAA ACA Tgg TAT ATA gA 3'
Fpol1773as	5' CTT TTC TCT AAT ATC CCC TC 3'
Fpol1490as	5' TCC TTC TAT CTC CAT TAT CTg C 3'
Fpol907as	5'-GCT TTT TGT ACT TCT CTC-3'
Fpol681as	5' TCT ACT TTT TgT TTA TgT TC 3'
Fpol453as	5' TAA ggA gCA TAA TCT ggA TC 3'

TABELA 3 – Sequência dos “primers” direcionados ao gene “pol”.

Os “primers” foram desenhados de forma que o final e início de cada fragmento amplificado fossem sobrepostos para evitar que alguma região do gene não fosse amplificada (Figura 1). Dessa forma seria possível o sequenciamento do gene completo, uma vez que, o aparelho sequenciador é limitado e não possibilita o sequenciamento de fragmentos maiores de 500pb, aproximadamente. As regiões amplificadas pelos primers foram denominadas de Vermelho, Azul, Verde, Rosa e Roxo para facilitar a compreensão (Tabela 4).

	Pares de Primers	Produto	Cores setas(Fig 1)
A	Fpol37s e Fpol453as	416pb	Vermelho
B	Fpol247s e Fpol681as	434pb	Azul
C	Fpol569s e Fpol907as	336pb	Verde
D	Fpol963s e Fpol1490as	527pb	Rosa
E	Fpol1410 e Fpol1773as	363pb	Roxo

TABELA 4. Pares de primers utilizados para amplificação do gene Pol.

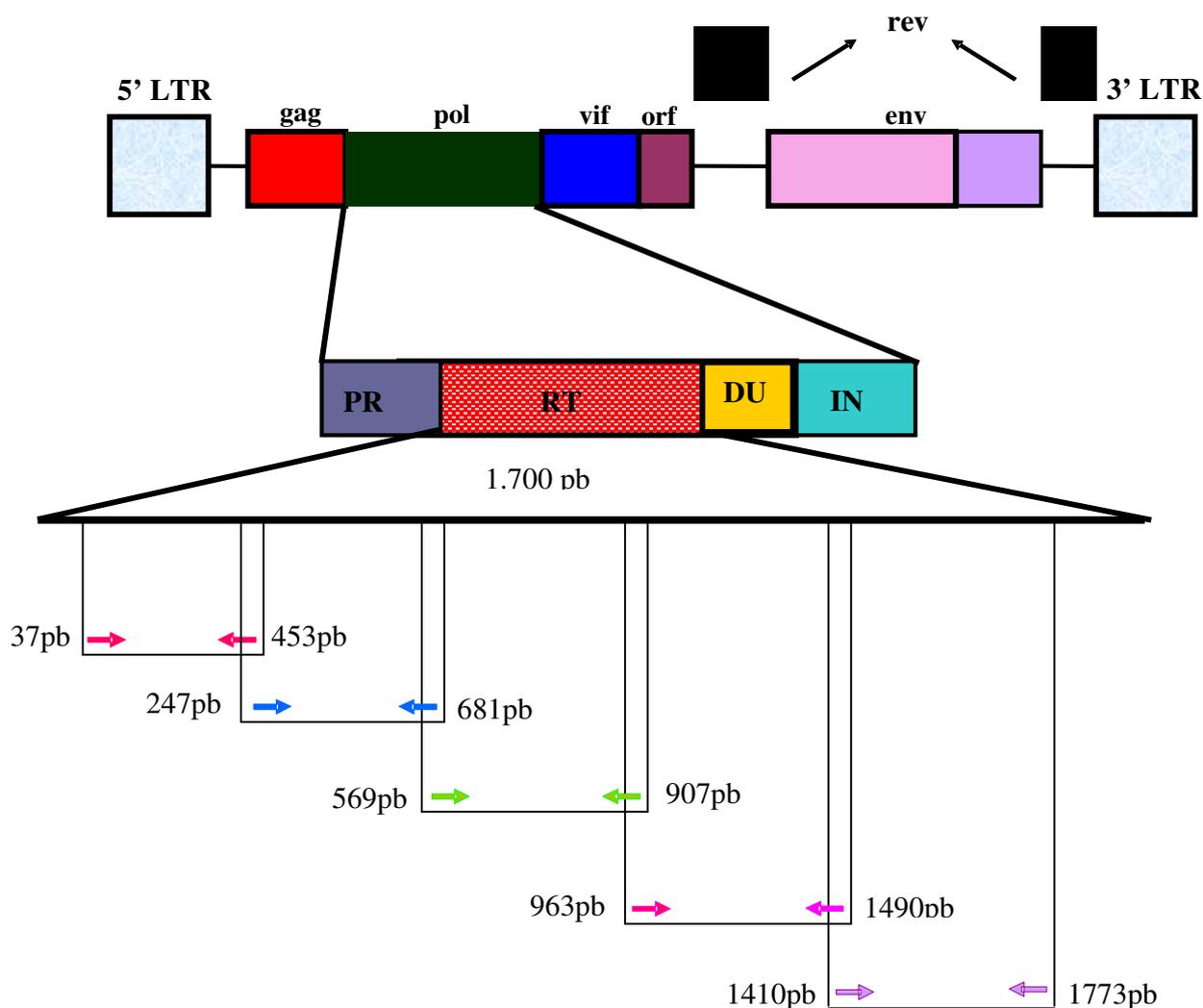


FIGURA 1 - Representação esquemática do genoma do vírus da imunodeficiência felina com a indicação dos “primers” utilizados nas reações da PCR para o gene “pol”.

As reações de amplificação foram realizadas pela técnica de semi-nested utilizando-se o GoTaq® Green Master Mix (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. Para a região Vermelho foram empregados os primers Fpol37s e Fpol681as para PCR e os primers Fpol37s e Fpol453as para semi-nested. Para a região Azul e Verde foram empregados Fpol247s e Fpol907as para PCR e Fpol247s e Fpol681as e Fpol569s e Fpol907as, respectivamente, para semi-nested. Para a região Rosa e Roxo foram empregados os primers Fpol963s e Fpol1773as e Fpol963s e Fpol1490as e Fpol1410 e Fpol1773as,

respectivamente , para o semi-nested. No PCR foram adicionados 5 $\mu$ L de cDNA e no semi-nested 2 $\mu$ L de produto.

As ampliações foram realizadas em termociclador automático (Eppendorf®). Numa etapa inicial, as amostras foram incubadas a 96°C por 6 min, após prévio aquecimento da tampa por 2 min, para as desnaturações, seguida de uma seqüência de 30 ciclos repetidos, compostos de três temperaturas para cada ciclo: 94° C/1min para desnaturação da fita de DNA, para anelamento dos primers as temperaturas estão listadas na Tabela 5 e 72°C por um minuto e meio para a extensão das fitas.

Primers e regiões	Temperatura de anelamento (Tm)
Fpol37s e Fpol681as	44 °C
Fpol247s e Fpol907as	44 °C
Fpol963s e Fpol1773as	47 °C
Vermelho, Rosa e Roxo	44 °C
Azul	44 °C
Verde	38 °C

TABELA 5. Lista das temperaturas de anelamento utilizadas para os diferentes pares de primers na amplificação do gene “pol”.

#### 4.7.2 Purificação de produtos amplificados no semi-nested

A purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento foi realizada com o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo instruções do fabricante. Quando a amplificação apresentou fragmentos inespecíficos a purificação foi realizada a partir de corte do fragmento esperado em gel de agarose 1,5%.

#### 4.7.3 Quantificação dos fragmentos de DNA

Após a extração e a purificação dos fragmentos amplificados, os mesmos foram submetidos 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” ® (Invitrogen) (Figura 7). 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.

#### **4.7.4 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 100 bp do fragmento é recomendada a adição de 10 ng de produto purificado, 1,0µl (2,5pmol/µl) de “primer” sense ou anti-sense, conforme o sentido do seqüenciamento, 2,0µl do Premix e água Ultra-pura (MilliQ®) suficiente para completar o volume final de 10µl.

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 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).

#### **4.7.5 Análise das seqüências de nucleotídeos obtidas**

A análise das seqüências de nucleotídeos obtidas foi realizada com o programa Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) comparando-se com a seqüência do subtipo B (TM2 acesso Genebank M59418). As seqüências sense e anti-sense de cada região foram comparadas para a verificação de concordância das bases.

#### **4.8 Análise estatística**

Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Friedman considerando estatisticamente significativas as comparações cujos níveis de significância (P) ficaram abaixo de 0,05.

## 5. Resultados

### 5.1 Animais positivos

Foram encontrados 12 animais positivos (5,9%), 7 fêmeas e 5 machos. Do total de animais analisados, 89 eram machos e 113 eram fêmeas. Só foram analisados animais cujos proprietários permitiriam a utilização dos mesmos no experimento.

Na Tabela 6 estão relacionadas a identificação de cada animal positivo com a origem e sinal clínico mais evidente no momento do diagnóstico.

<b>Animal</b>	<b>Origem</b>	<b>Sexo</b>	<b>Sinais clínicos</b>
T1	Sorocaba	Macho	Assintomático
T2	Botucatu	Fêmea	Assintomático
T3	Piracicaba	Fêmea	Assintomático
T4	Botucatu	Fêmea	Assintomático
T5	Botucatu	Macho	Assintomático
T6	Botucatu	Fêmea	Assintomático
C1	Botucatu	Fêmea	Assintomático
C2	Piracicaba	Macho	Dermatofilose
C3	Botucatu	Macho	Assintomático
C4	Sorocaba	Macho	Infecção respiratória
C5	Botucatu	Fêmea	Diarréia crônica
C6	Botucatu	Fêmea	Assintomático

TABELA 6- Número, origem e sinal clínico mais evidente no momento do diagnóstico dos 12 animais selecionados para o experimento.

### 5.2 Tratamento com AZT e coletas de sangue

O tratamento com AZT teve início no dia 05 de Dezembro de 2006 e término no dia 11 de Março de 2007 totalizando 96 dias de tratamento. As coletas de sangue para quantificação viral e monitoramento hematológico tiveram início no dia 0 (antes da administração da droga). No primeiro mês as coletas tiveram intervalo de uma semana e

posteriormente foram realizadas, aproximadamente, a cada 15 dias até um mês depois de cessada a administração da droga (dia 09 de Abril de 2006).

### 5.3 Quantificação viral por PCR em tempo real

#### 5.3.1 Normalizador

Cultivado em células Vero, o Poliovírus apresentou  $DICT_{50} = 10^{-6,89}$ . Em cada amostra de soro foram adicionados 10 $\mu$ L de sobrenadante de cultivo celular a 1000 $DICT_{50}$ .

#### 5.3.2 Curvas padrão para quantificação

As curvas padrão para o FIV (Figura 2) e para o GAPDH (Figura 4) foram construídas diluindo-se o DNA do animal 5, sendo o primeiro ponto puro depois 1:2, 1:4 e 1:8. As Tabelas 7 e 8 apresentam, respectivamente, os valores relativos calculados pelo programa SDS 1.2.3 com o “threshold” determinado na fase exponencial da curva de amplificação para FIV e GAPDH.

Pontos (FIV)	Média Ct	Desvio padrão dos Ct	Valor relativo
Puro	26,65	0,004	100
1:2	27,42	0,113	50
1:4	28,99	0,122	25
1:8	29,61	0,460	12,5

TABELA 7. Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do DNA do animal 5 utilizados para curva FIV.

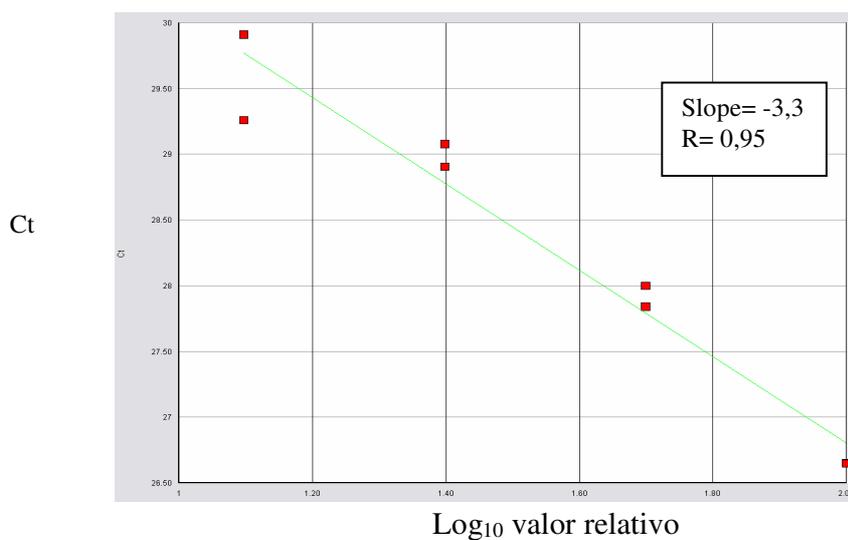


FIGURA 2. Representação gráfica da curva padrão do FIV com pontos desde puro a 1:8.

A curva padrão do FIV apresentou eficiência de 100% e coeficiente de correlação (R) igual a 0,95.

A Figura 3 representa a curva de dissociação produzida pela amplificação das amostras de FIV. Pode-se observar a formação de um pico único que apresenta uma variação de T<sub>m</sub> entre 76,3 e 76,6°C.

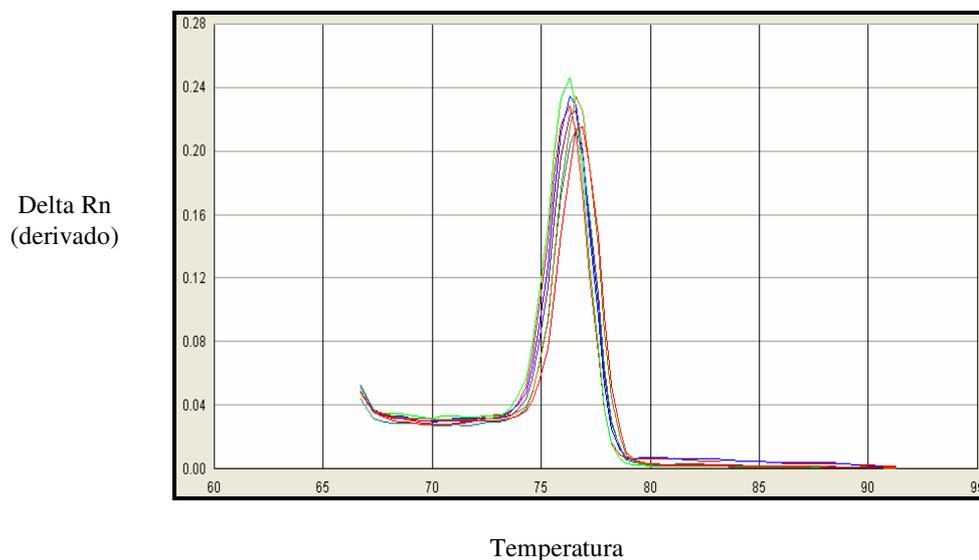


FIGURA 3. Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para o FIV desde puro a 1:8

Pontos (GAPDH)	Média Ct	Desvio padrão dos Ct	Valor relativo
Puro	20,14	0,163	100
1:2	21,11	0,002	50
1:4	22,43	0,032	25
1:8	23,57	0,094	12,5

TABELA 8. Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do DNA do animal 5 utilizados para curva GAPDH.

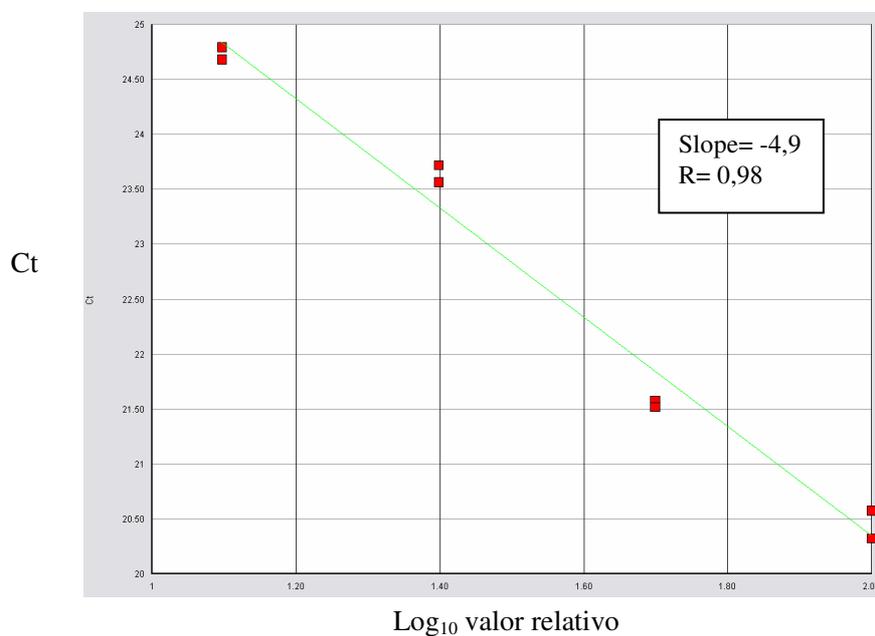


FIGURA 4. Representação gráfica da curva padrão do GAPDH.

A curva padrão do GAPDH apresentou eficiência igual a 59,9% e R igual a 0,98.

A Figura 5 é a representação da curva de dissociação produzida pela amplificação das amostras para GAPDH desde puro a 1:8. Pode-se observar a formação de pico único que apresenta uma variação de  $T_m$  entre 78,4 e 79,9°C.

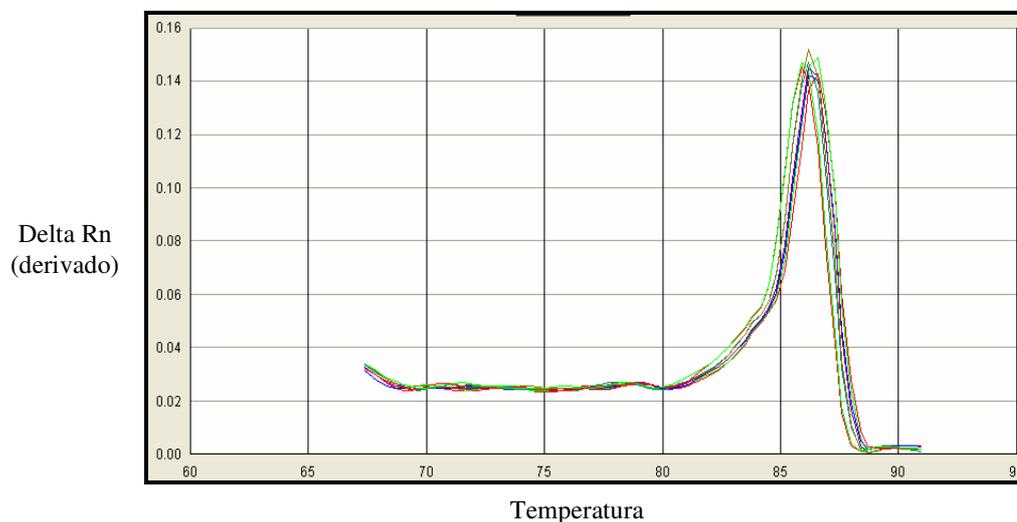


FIGURA 5. Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para GAPDH desde puro a 1:8.

Para o Poliovírus a curva padrão (Figura 6) foi construída a partir de cDNA puro, 1:10, 1:100 e 1:1000. Na Tabela 9 estão apresentados os valores relativos calculados pelo programa SDS 1.2.3 com o “threshold” determinado na fase exponencial da curva de amplificação.

Pontos (Poliovírus)	Média Ct	Desvio padrão dos Ct	Valor relativo
Puro	13,59	0,210	100
1:10	17,49	0,099	10
1:100	21,79	0,045	1
1:1000	26,60	0,550	0,1

TABELA 9. Valor relativo, médias e desvios-padrão dos Ct do cDNA de Poliovírus

A curva padrão do Poliovírus apresentou eficiência igual a 70,82% e R igual a 0,99.

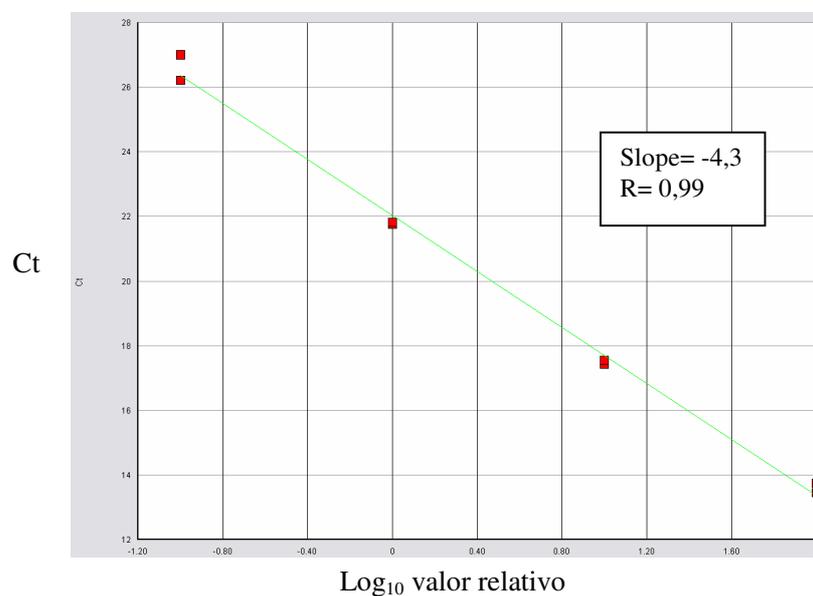


FIGURA 6. Representação gráfica da curva padrão do Poliovírus.

A Figura 7 representa a curva de dissociação produzida pela amplificação das amostras para Poliovírus desde puro a 1:1000. Pode-se observar a formação de pico único que apresenta Tm variando de 78,4 a 79,9°C.

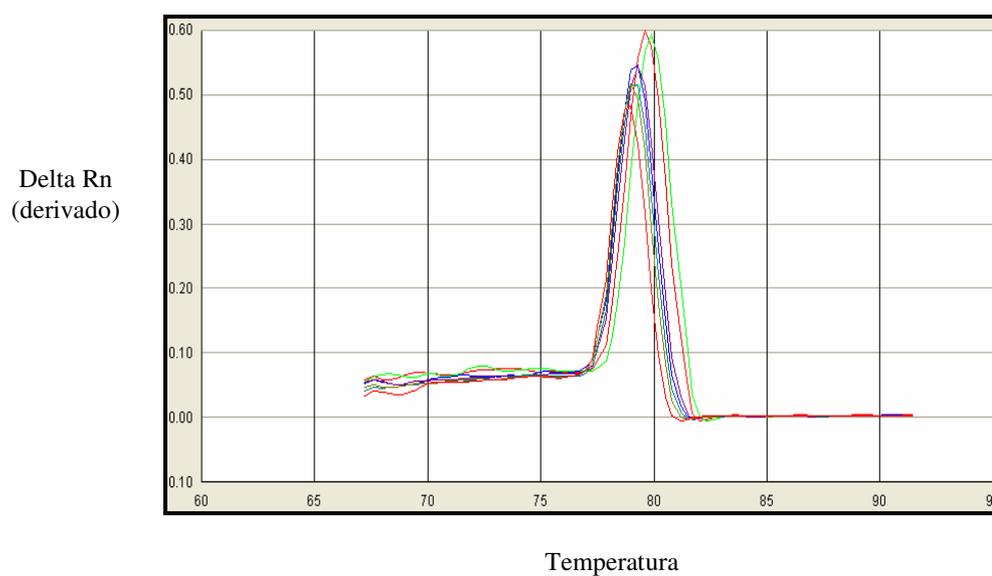


FIGURA 7. Gráfico da curva de dissociação obtida da PCR em Tempo Real para Poliovírus desde puro a 1:1000.

### 5.3.3 Quantificação relativa da carga viral e DNA proviral

Na Tabela 10 estão relacionadas as medianas dos valores de FIV obtidos dos grupos tratado e controle.

Houve diferença estatisticamente significativa de carga viral de cada grupo em relação aos momentos (tratado  $P = 0,035$  e controle  $P = 0,002$ ), entretanto, entre grupos em cada momento não houve diferença (Tabela 11).

Grupo	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 36	Dia 49	Dia 62	Dia 80	Dia 96	Dia 111	Dia 125
T1	67,58	3,62	3,78	2,16	1,07	4,75	1,30	7,70	17,57	32,07
T2	5,21	1,25	0,79	4,75	-	2,28	1,99	-	3,29	1,73
T3	7,43	0,80	0,48	2,87	0,71	1,57	0,39	-	-	-
T4	2,08	0,18	0,19	0,33	-	0,53	-	0,32	-	0,75
T5	0,21	0,55	0,24	1,33	-	0,70	-	-	1,71	0,50
T6	0,30	-	-	-	-	-	0,34	-	-	-
C1	14,46	1,09	1,17	3,90	1,02	1,25	0,49	2,81	1,18	2,16
C2	3,03	-	0,45	1,70	-	1,63	-	-	-	-
C3	1,35	0,57	0,20	0,78	0,39	0,57	0,20	-	0,74	0,43
C4	2,02	0,19	0,20	0,46	0,36	0,57	-	2,18	5,96	-
C5	1,92	1,05	0,19	24,11	0,82	-	0,37	-	1,18	1,76
C6	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55

TABELA 10. Mediana dos valores relativos de FIV obtidos calculados pelo programa SDS 1.2.3 (Applied Biosystems).

Momentos	Valor de P
Dia 0	0,931
Dia 7	0,931
Dia 14	0,931
Dia 36	0,792
Dia 49	0,247
Dia 62	0,662
Dia 80	0,662
Dia 96	0,931
Dia 111	0,792
Dia 125	0,792

TABELA 11. Valores de P ente grupos tratado e controle em cada momento.

A Figura 8 é a representação gráfica dos valores das medianas de grupos em relação a cada momento. A carga viral variou desde indetectável a 3,65. Pode-se observar uma tendência igual dos dois grupos ao longo do experimento.

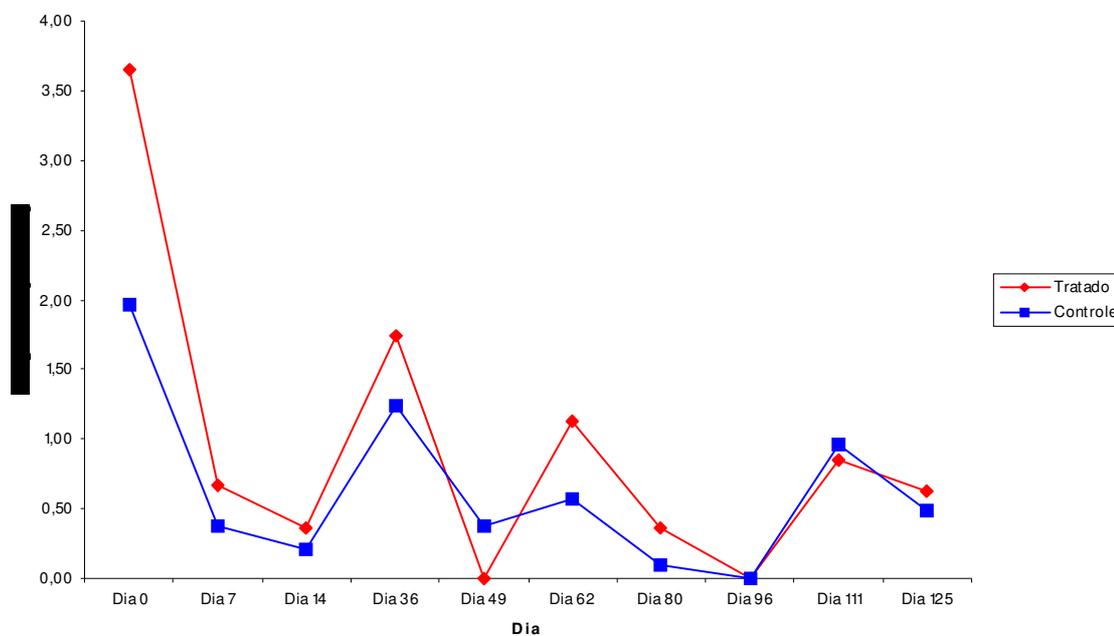


FIGURA 8 Representação gráfica dos valores de FIV.

Outra forma de quantificar a carga viral foi com a utilização das curvas padrão de FIV e Poliovírus normalizando-se os valores obtidos, de acordo com a fórmula:

$$Q_x = \frac{\text{MAIOR VALOR DE POLIOVIRUS}}{\text{VALOR DE POLIOVIRUS}_x} \times \text{VALOR DE FIV}_x$$

onde  $Q_x$  é a quantidade de FIV de cada amostra em dado momento. O maior valor (média da triplicata) de Poliovírus foi dividido por cada valor (média da triplicata) das amostras teste. Assim, multiplicando-se cada um desses valores pelos respectivos valores (média da triplicata) de FIV de cada amostra teste foi possível normalizar os valores.

Na Tabela 12 estão relacionadas as medianas dos valores de FIV normalizados com os valores de Poliovírus.

Houve diferença estatisticamente significativa do grupo tratado em relação a cada momento ( $P = 0,002$ ), entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa do grupo controle em relação a cada momento ( $P = 0,061$ ) nem entre grupos em cada momento (Tabela 13).

Grupo	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 36	Dia 49	Dia 62	Dia 80	Dia 96	Dia 111	Dia 125
T1	97,15	53,09	46,47	21,98	10,90	25,22	4,25	17,31	72,06	122,41
T2	12,97	20,71	13,28	9,87	-	9,91	1,32	-	7,47	3,50
T3	13,01	8,30	6,97	3,31	3,17	5,60	0,39	-	-	-
T4	3,61	2,31	2,15	1,72	-	3,35	-	0,82	-	2,48
T5	0,83	12,33	3,59	1,85	-	6,24	-	-	7,01	2,25
T6	0,48	-	-	-	-	-	0,47	-	-	-
C1	33,01	12,96	17,76	14,82	7,03	10,87	0,91	8,59	4,79	7,46
C2	5,69	0,00	5,62	2,33	-	7,56	-	-	-	-
C3	2,76	6,70	2,80	1,40	2,28	5,11	0,25	-	2,62	1,62
C4	5,62	1,93	2,81	1,21	3,21	4,79	-	6,66	17,57	-
C5	6,02	11,39	3,79	33,10	3,13	-	1,06	-	7,34	8,59
C6	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	1,57

TABELA 12. Mediana dos valores relativos de FIV normalizados com Poliovírus obtidos pelo programa SDS 1.2.3 (Applied Biosystems).

Momentos	Valor de P
Dia 0	0,818
Dia 7	0,310
Dia 14	0,699
Dia 36	0,818
Dia 49	0,589
Dia 62	0,589
Dia 80	0,485
Dia 96	1,000
Dia 111	1,000
Dia 125	0,818

TABELA 13. Valores de P entre grupos tratado e controle em cada momento.

A Figura 9 é a representação gráfica dos valores normalizados de carga viral. A carga viral variou de indetectável a 10,32. As tendências dos dois grupos foram semelhantes.

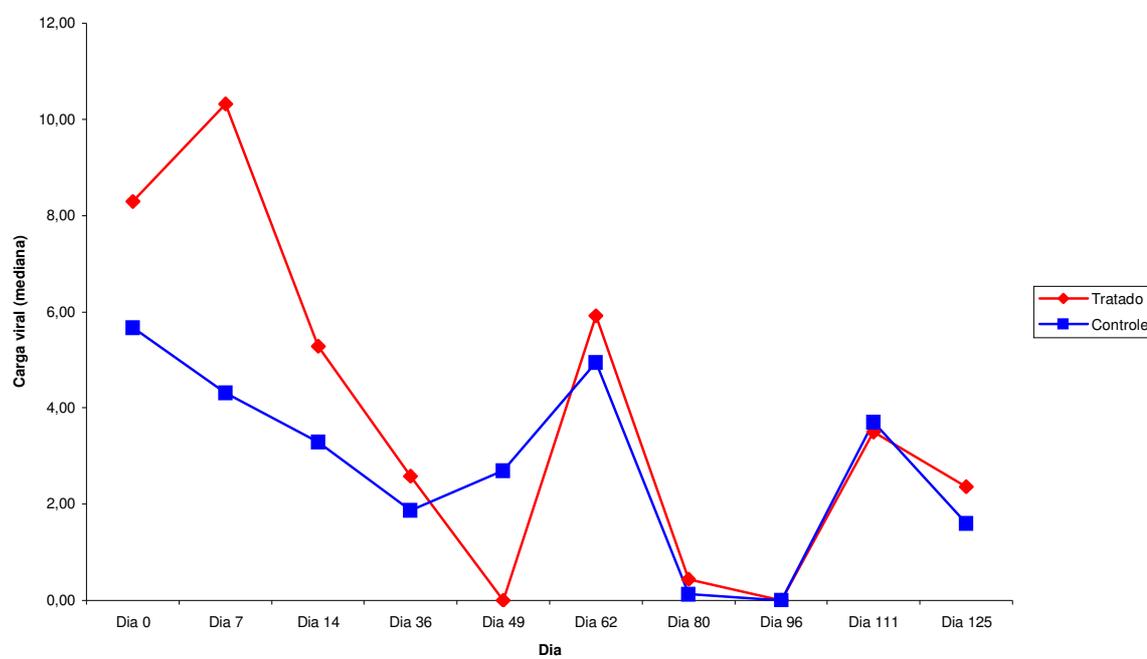


FIGURA 9. Representação gráfica das medianas dos valores de FIV, de cada grupo, normalizados com Poliovírus.

A concentração relativa do DNA proviral foi realizada com a normalização dos valores de FIV com os valores de GAPDH utilizando-se a mesma forma de cálculo empregada com o Poliovírus. Esta análise foi realizada em quatro momentos do experimento devido às amostras de DNA terem sido colhidas apenas nesses momentos. As medianas dos valores estão demonstradas na Tabela 14.

Houve diferença estatisticamente significativa de cada grupo em relação aos momentos (tratado  $P = 0,02$  e controle  $P = 0,02$ ), entretanto entre grupos em cada momento não houve diferença (Tabela 12).

Grupo	Dia 0	Dia 96	Dia 111	Dia 125
T1	3473,68	20514,89	21456,12	19560,83
T2	82,28	210,32	168,77	277,91
T3	570,66	1858,80	1395,71	1606,35
T4	70,87	360,05	240,65	279,41
T5	48,51	202,60	151,87	251,89
T6	10,04	-	25,00	27,32
C1	269,76	874,93	1162,61	1185,60
C2	218,63	478,39	517,05	687,75
C3	72,49	219,50	183,59	246,40
C4	214,79	611,22	404,31	636,80
C5	170,34	26,18	787,88	1085,32
C6	50,98	85,03	62,13	199,80

TABELA 14. Mediana dos valores de FIV normalizados com GAPDH obtidos pelo programa DAS 1.2.3 (Applied Biosystems).

Momentos	Valor de P
Dia 0	0,699
Dia 96	0,937
Dia 111	0,818
Dia 125	1,000

TABELA 15. Valores de P entre grupos tratado e controle em cada momento.

A Figura 10 é a representação gráfica das quantidades de FIV do grupo tratado e controle com valores normalizados com GAPDH. A carga viral variou de 76,6 a 662,3.

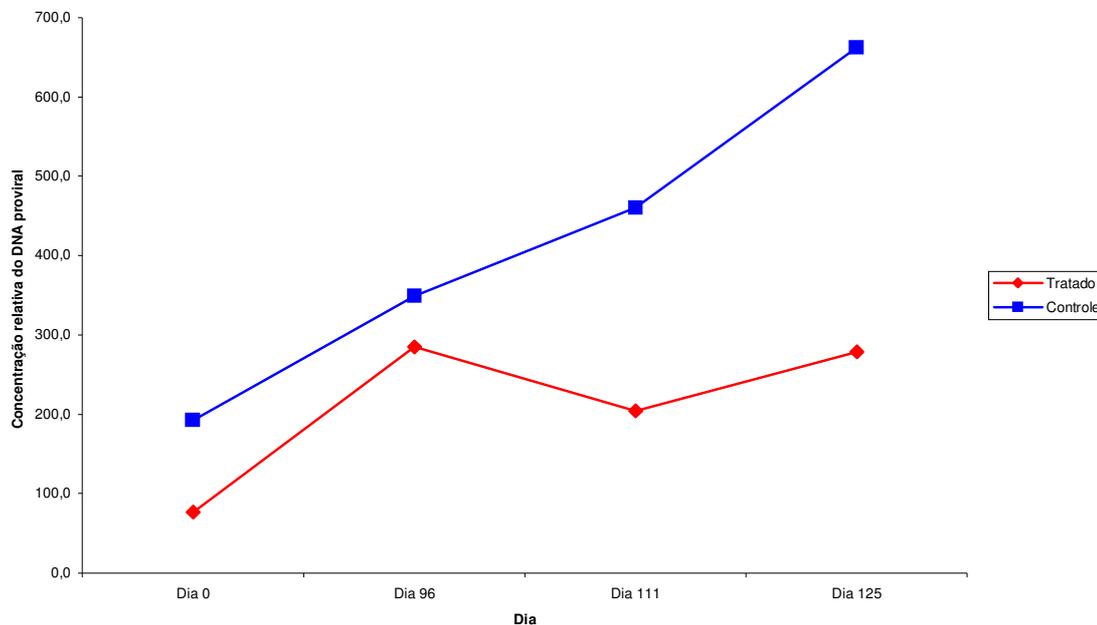


FIGURA 10. Representação gráfica das medianas dos valores de FIV, de cada grupo, normalizados com GAPDH.

#### 5.4 Sequenciamento genético

Foi obtido o sequenciamento genético do fragmento do gene “pol” que codifica a Transcriptase Reversa ( $\cong 1.700\text{pb}$ ) apenas dos animais T1, T3 e C2. No momento Dia0 foi possível sequenciar o fragmento completo dos 3 animais, no entanto, no momento Dia96 foi possível o sequenciamento do fragmento completo apenas para o animal 1, para o animal C2 foram sequenciados 727pb e para o animal T3 apenas 1449pb. No momento Dia 111 foram sequenciados 628pb do animal T1, não foi possível sequenciar qualquer fragmento do animal C2 e para o animal T3 apenas 351pb.

A partir das seqüências de nucleotídeos foi possível deduzir a seqüência de aminoácidos codificada. A Figura 8 apresenta as seqüências de aminoácidos do fragmento correspondente ao gene “pol” onde se localiza a atividade de polimerase da enzima Transcriptase reversa e, portanto, região onde as mutações de resistência ao AZT podem surgir (Larder & Kemp, 1989). Na Figura, pontos representam aminoácidos iguais e traços representam regiões em que não foram sequenciados os nucleotídeos.

	1	11	21	31	41
TR_FIV-B	ISEKIPIVKV	RMKDPTQGPQ	VKQWPLSNEK	IEALTDIVER	LESEGKVKR
Animal_1_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_96	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_111	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_5_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_5_Dia_96	-----	-----	-----	-----	-----
Animal_6_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_6_Dia_96	-----	-----	-----	-----	-----
Animal_6_Dia_111	.....	.....	.....	.....	.....
	50	60	70	80	90
TR_FIV-B	ADPNNPWNT	VFAIKKSGK	WRMLIDFRVL	NKLTDKGAEV	QLGLPHPAG
Animal_1_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_96	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_111	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_5_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_5_Dia_96	-----	-----	-----	-----	-----
Animal_6_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_6_Dia_96	-----	-----	-----	-----	-----
Animal_6_Dia_111	.....	.....	.....	.....	.....
	99	109	119	129	139
TR_FIV-B	LQMKKQVTVL	DIGDAYFTIP	LDPDYAPYTA	FTLPRKNNAG	PGRRYVWCS
Animal_1_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_96	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_1_Dia_111	.....	-----	-----	-----	-----
Animal_5_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_5_Dia_96	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_6_Dia_0	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_6_Dia_96	.....	.....	.....	.....	.....
Animal_6_Dia_111	.....	-----	-----	-----	-----
	148	158	168	178	188
TR_FIV-B	LPQGWLSP	IYQSTLNNIL	QPFIKQNSEL	DIYQYMDDIY	IGSNLNKKE
Animal_1_Dia_0	.....	.....D...	.....	.....	.....S...
Animal_1_Dia_96	.....	.....D...	.....	.....	.....S---
Animal_1_Dia_111	-----	-----	-----	-----	-----
Animal_5_Dia_0	.....	.....D...	.....P..	.....	.....S...
Animal_5_Dia_96	.....	.....D...	.....P..	.....	.....S...
Animal_6_Dia_0	.....	.....D...	.....P..	.....	.....S..-
Animal_6_Dia_96	.....	.....D...	.....P..	.....	.....S...
Animal_6_Dia_111	-----	-----	-----	-----	-----
	197	207	217	227	
TR_FIV-B	HKQKVEELRK	LLLWWGFETP	EDKLQEEPPY	KWMGYEL	
Animal_1_Dia_0	..R.....E	.....	.....	.....	
Animal_1_Dia_96	..R.....E	.....	.....	.....	
Animal_1_Dia_111	--R.....E	.....	.....	.....	
Animal_5_Dia_0	.....K.	.....	.....	.....	
Animal_5_Dia_96	.....	.....	.....	.....	
Animal_6_Dia_0	-----	.....	.....	.....	
Animal_6_Dia_96	.-----	-----	-----	.....	
Animal_6_Dia_111	-----	-----	-----	-----	

FIGURA 11. Alinhamento das seqüências de aminoácidos correspondente a TR do FIV dos animais e do FIV TM2. Pontos representam aminoácidos iguais e traços representam regiões em que não foram seqüenciados os nucleotídeos.

Comparando-se a seqüência de aminoácidos pode-se visualizar grande semelhança entre as proteínas. A diferença entre as proteínas foi de apenas 6 aminoácidos, mas entre os vírus a diferença foi de apenas 4. Com exceção do animal 5 na posição 205, as diferenças de aminoácidos foram mantidas nos 3 momentos analisados. Entre os animais C2 e T3 que são originários do mesmo gatil ocorreu apenas 1 aminoácido diferente

## 6. Discussão

Em um levantamento epidemiológico da infecção pelo FIV no Estado de São Paulo Lara et al. (2006) encontraram 15,6% de infecção sendo a ocorrência entre gatos machos duas vezes maior do que em fêmeas. Em nosso estudo, entretanto, encontramos 5,9% de positividade sendo a ocorrência igual entre machos e fêmeas. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que mais da metade das amostras analisadas eram de gatos originados de gatis particulares ou mesmo de locais onde a esterilização dos machos é freqüente. Os machos castrados não apresentam atitudes de demarcação de território e disputa por fêmeas o que diminui a exposição tanto dos machos quanto das fêmeas ao FIV.

A técnica de diagnóstico utilizada, a PCR, oferece rapidez, alta sensibilidade e especificidade em comparação com outros métodos (Gunson et al., 2006). A PCR em tempo real tem demonstrado vantagens ainda maiores do que os já conhecidos benefícios da PCR. Em especial atenção, a PCR em tempo real permite o monitoramento quantitativo da infecção viral.

Este é o primeiro relato no Brasil de monitoramento quantitativo da infecção do FIV concomitantemente com tratamento antiretroviral com AZT. Além disso, diferentemente da maioria dos trabalhos internacionais, o monitoramento foi realizado em gatos naturalmente infectados para que os resultados obtidos fossem diretamente aplicados na prática veterinária.

Para padronização da PCR em tempo real foram utilizadas três técnicas diferentes. O primeiro sistema de detecção foi o Light Upon Extension (LUX) (Invitrogen) que possui um dos “primers” marcado com substância fluorescente, escolhido por apresentar alta sensibilidade e especificidade com médio custo. Entretanto, foi constatado que a amplificação apresentou baixo sinal e os resultados não seriam confiáveis (Dados não apresentados).

O segundo sistema chamado de Taq Man (Applied Biosystems) utiliza sondas para a detecção. Os primers e a sonda utilizados foram escolhidos a partir do trabalho de Bisset et al. (2002), desenhados para uma região conservada do vírus, o gene “pol”. O sistema Taq Man promove a captação de grande fluorescência durante as amplificações facilitando a interpretação dos resultados. Não houve sucesso nas amplificações, provavelmente, devido ao fato de que os primers e a sonda foram desenhados para o subtipo A e não anelaram

corretamente no subtipo B, apesar de direcionados para região conservada do vírus (Dados não apresentados).

O terceiro sistema para a amplificação do FIV, selecionado para o presente trabalho, foi o sistema de detecção baseado nos corantes que se intercalam nas duplas-fitas de DNA, como o SYBR<sup>®</sup> Green I (Invitrogen). Este sistema possibilita a utilização de diferentes “primers” reduzindo, assim, os custos para aplicação da técnica se comparada com “primers” marcados (LUX) e sondas (Taq Man). Apesar de ser menos específica do que as outras técnicas, o SYBR<sup>®</sup> Green I permite a análise da curva de dissociação garantindo a especificidade de cada reação.

O sistema SYBR<sup>®</sup> Green I permitiu o estudo da concentração relativa do FIV e do DNA proviral. A determinação das concentrações relativas nas amostras testadas foi realizada com a construção de curvas padrão constituídas de quatro diluições das amostras de referência. Este tipo de quantificação mostrou ser um método simples e permitiu a comparação da quantidade de FIV detectada nas amostras com relação ao cDNA ou DNA (carga viral e concentração relativa do DNA proviral, respectivamente) de referência. O cDNA ou DNA de referência menos diluído recebeu valor igual a 100 e se uma amostra testada apresentou um valor igual a “n” ela possui “n” % mais ou menos FIV quando comparado ao DNA de referência que recebeu o valor igual a 100. Normalmente a quantificação relativa é determinada através da equação  $Q_r = 2^{-\Delta Ct}$  onde  $Q_r$  é o valor da quantificação e  $\Delta Ct$  a diferença entre o valor de Ct da amostra teste em relação à amostra de referência (Livak & Schmittgen, 2001). Entretanto, esse cálculo só é válido quando a amplificação é extremamente eficiente, ou seja, a cada amplificação o número de cópias é duplicado. Isso raramente é obtido na prática, pois muitas variáveis podem interferir na amplificação, como tempo de rampa, qualidade da polimerase e “primers”, pureza da amostra, concentração de íons  $Mg^{++}$ , entre outros (Sambrook & Russel, 2001). Com a adoção da curva padrão e o valor de 100 para a amostra de referência menos diluída, mesmo que a reação não seja tão eficiente, a determinação da concentração relativa é mais exata e precisa que aquela obtida com a aplicação do  $\Delta Ct$ .

Para a concentração relativa do FIV foram testadas duas formas de quantificação. A primeira delas foi calcular o FIV utilizando-se os valores relativos obtidos pelo programa SDS 1.2.3 que levou em consideração a curva padrão (Tabela 7). Observou-se

reprodutibilidade e especificidade das reações constatada a partir da análise das curvas de dissociação (Figura 2) que apresentaram pico único sob pequena variação de temperatura entre as amostras testadas. Além disso, a eficiência de amplificação e o coeficiente de correlação tiveram valores ideais, 100% e 0,95, respectivamente.

Mesmo havendo confiabilidade na quantificação com a curva padrão do FIV, outra forma de quantificação foi realizada. Aplicando-se a estratégia de normalização pode-se controlar a quantidade inicial de amostra, variações de eficiência entre amplificações e diferenças entre amostras (Bustin et al., 2005). O que se utiliza normalmente para normalização são “primers” direcionados a genes cujas expressões são relativamente constantes como o gene GAPDH, Beta-actina, entre outros. Entretanto, para a quantificação de vírus circulante em plasma não há como se amplificar genes, uma vez que não há células nas amostras. Este é o primeiro relato da aplicação do Poliovírus como normalizador de amplificações. O Poliovírus cultivado em células foi adicionado em quantidades iguais em cada amostra de soro dos animais antes de cada extração de RNA. Em cada reação de amplificação o Poliovírus foi detectado com o emprego de “primers” específicos. A concentração relativa do FIV foi calculada a partir dos valores apresentados pelo programa SDS 1.2.3 normalizados com os valores de Poliovírus de cada amostra obtidos também pela construção de curva padrão. Apesar de a amplificação do Poliovírus ter apresentado curvas de dissociação com pico único (Figura 3) e coeficiente de correlação de 0,99, não foi possível obter bons valores de eficiência, ficando em 70,83%. Para a quantificação da concentração relativa do DNA proviral foram empregados os mesmos “primers” de FIV, mas como normalizadores foram utilizados os “primers” direcionados ao gene GAPDH celular. Apesar de apresentar pico único nas curvas de dissociação e coeficiente de correlação igual a 0,98 a eficiência da reação não apresentou valores ideais, ficando em 59,9%. Entretanto, como já mencionado, pelo fato de se utilizar a curva padrão em todas as placas analisadas a quantificação foi bastante confiável, fato que não acontece quando se aplica a fórmula  $Qr = 2^{-\Delta Ct}$ , normalmente aplicada quando se deseja quantificação relativa. Assim, o normalizador que não apresentou eficiência parecida com a do alvo pode ser utilizada.

O AZT é recomendado na dose de 5mg/kg/dia BID por via subcutânea por promover melhora da estomatite, conjuntivite, alopecia e do estado imunológico (aumento da razão CD4/CD8) e também por promover efeitos adversos moderados e toleráveis pelos gatos (Hatman et al., 1992). Em nosso experimento o AZT foi administrado na dose de 10mg/kg/dia SID por via oral para que, caso a droga seja aprovada para utilização em medicina veterinária, seja de fácil administração para os proprietários dos animais.

Utilizando-se as três formas de quantificar o FIV no organismo animal proposta neste experimento, não houve diferença estatisticamente significativa da carga viral ou da concentração relativa do DNA proviral entre o grupo tratado e controle ( $P > 0,05$ ). Observou-se apenas a diferença significativa do primeiro momento com os demais indicando uma queda inicial da carga viral (Figuras 8 e 9) com a manutenção de valores em níveis mais baixos ao longo do tratamento, tanto para o grupo tratado quanto para o grupo controle. Arai et al. (2002) demonstraram inibição da replicação do FIV *in vitro* quando a concentração de AZT no cultivo celular foi entre 0,1 e 0,5 $\mu$ M. A concentração plasmática média de AZT no animal com dose de 5mg/kg é de 0,25 a 0,3 $\mu$ M (Jordan et al., 2001), a concentração plasmática máxima na dose de 25mg/kg é 28,8 $\mu$ g/ml em tempo máximo de 40,2min (Zhang et al., 2004). Em conjunto, esses dados indicam que a concentração de AZT na dose de 10mg/kg/dia SID, empregada no nosso experimento, atingiria níveis inibitórios da replicação do FIV somente durante 14 horas após administração. Entre as administrações o vírus pôde se replicar, o que, provavelmente determinou o insucesso do tratamento.

Nas Figuras 8 e 9 observa-se uma semelhança de tendências das curvas como se tivesse ocorrido um fator externo atuando em todos os animais que promovesse a diminuição ou aumento da carga viral. Esse fator pode ter sido o estresse sofrido pelos animais devido às constantes coletas de sangue. No intuito de se obter o maior número de momentos possível para o acompanhamento cinético do vírus, não levamos em consideração que o estresse poderia influenciar nos dados.

No intuito de monitorar a evolução de variantes virais ao longo do experimento foram realizadas reações de sequenciamento antes durante e depois do tratamento. Infelizmente, nossa equipe também enfrentou grandes dificuldades durante a padronização da técnica de sequenciamento. Desta forma, levou-se muito tempo para que se conseguisse

a amplificação de 5 pares de “primers” desenhados para a região do gene “pol” codificadora da proteína TR. Foi possível a amplificação do fragmento completo esperado somente de amostras de 3 animais (T1, T3 e C2).

Ao se comparar a seqüência de aminoácidos da TR do FIV dos 3 animais com a TR do FIV subtipo B (TM2, número de acesso Genebank M59418) pode-se observar grande semelhança. Há apenas 6 aminoácidos diferentes entre os dois vírus e entre os vírus dos animais do experimento existem apenas 4 aminoácidos diferentes. Em 2004, Ikeda et al. demonstraram alta estabilidade genética do vírus TM2 ocorrendo a substituição de apenas um aminoácido ao longo de 10 anos de monitoramento da região variável do gene “env”. Com essa informação é possível deduzir que se ocorreu apenas uma substituição na região de variabilidade que determina o tipo viral (Sodora et al., 1994), no gene “pol”, que é mais conservado entre os subtipos, não deve ocorrer muitas diferenças ao longo da infecção. Assim, podemos supor que existe grande semelhança entre vírus de uma mesma região, hipótese fortemente apoiada pelo fato de que o vírus nos animais C2 e T3 originários de um mesmo gatil apresentaram apenas um aminoácido diferente e o vírus do animal T1 apresentou 3 aminoácidos diferentes dos demais. Pode-se deduzir também que os vírus dos animais originários de Botucatu são muito semelhantes ao vírus do animal 1, que é desta mesma cidade.

Na posição 41 da seqüência de aminoácidos do HIV ocorre uma metionina e na do FIV ocorre uma lisina. A presença da lisina determina um fenótipo na TR do HIV de resistência ao AZT em cerca de 4 vezes (Kellam et al., 1992).

Como o FIV subtipo B apresenta alta estabilidade genética (Ikeda et al., 2004) pode-se supor que as TR dos outros animais podem possuir a mesma lisina na posição 41 da TR ainda mais que esta região apresentou alta semelhança entre os vírus dos animais (Figura 11). Sabendo-se que a TR do HIV e do FIV apresentam sensibilidades semelhantes ao AZT (North et al., 1990) supomos que a presença da lisina pode ter contribuído com a não diminuição da carga viral com administração do AZT.

Este experimento enfrentou inúmeras dificuldades ao longo de sua execução. Houve grande dificuldade em se conseguir a amostragem animal proposta. Muitos proprietários de gatis não consentiam o recolhimento dos animais. A padronização da PCR em tempo real foi laboriosa e foi necessário muito tempo para que se conseguissem resultados

satisfatórios. Durante a padronização do PCR para o sequenciamento genético os “primers” demonstraram ampliações eficientes para a mistura de amostras, mas quando aplicados em cada uma separadamente, por motivos desconhecidos, não amplificaram para 9 delas.

## **7. Conclusões**

A administração do AZT na dose de 10mg/kg/dia não diminuiu a carga viral nem o DNA proviral.

O sequenciamento genético da região codificadora da Transcriptase reversa revelou conservação entre vírus de uma mesma região, além de demonstrar a presença de lisina na posição 41 que é relacionada ao fenótipo de resistência ao AZT.

O sistema SYBR<sup>®</sup> Green I e a quantificação relativa utilizando curvas padrão mostrou ser um método simples e permitiu a comparação da quantidade de FIV detectada nas amostras com relação ao DNA (carga viral e concentração relativa do DNA proviral, respectivamente) de referência.

A normalização com o Poliovírus tipo 1 demonstrou ser ferramenta importante tanto como controle interno como normalizador da reação.

## 8. Referências Bibliográficas

AMACKER, M., Hottiger, M., Hübscher, U. Feline immunodeficiency virus reverse transcriptase: expression, functional characterization, and reconstitution of the 66- and 51-kilodalton subunits. *J. Virol.* v. 69, p. 6273-6279, 1995.

ARAI, M., Earl, D.D., Yamamoto, J. K. Is AZT/3TC therapy effective against FIV infection or immunopathogenesis? *Vet. Immunol. Immunopath.* v. 85, p. 189-204, 2002.

ARION, D. Et al. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*, v. 37, p. 15908-15917, 1999.

ARION, D., Sluis-Cremer, N., Parniak, M.A. Mechanism by which phosphonoformic acid resistance mutations restore 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) sensitivity to AZT-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 9251-9255, 2000.

BECHER, F. et al. Development of direct assay for measuring intracellular AZT triphosphate in humans peripheral blood mononuclear cells. *Anal. Chem.*, v. 74, p. 4220-4227, 2002.

BISSET, L.R., Lutz, H., Boni J, et al. Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. *Antiviral Res.*, v.53, p. 35-45, 2002.

BISSET, L.R. et al. Quantification of in vitro replication using a one-tube real-time RT-PCR system incorporated direct DNA preparation. *Journal of Virological Methods*, v. 91, p. 149-155, 2001.

BOUCHER, C.A. et al. Ordered of appearance of zidovudine resistance mutation during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.*, v. 165, p. 105-110, 1992.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 34, p. 597-601, 2005.

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.

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. *Virus Reviews & Research* 8 (Supl.), p. 209 Anais, 2003.

CRONN, R.C. et al. Inhibition of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus by analogs of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate. *Bochem. Pharmacol.* v. 44, p. 1375-1381, 1992.

EIROS, J.M. et al. Prevalence of genotypic resistance in untreated HIV-infected patients. *Rev. Esp. Quimioterap.*, v. 17, p. 250-256, 2004.

EL SAFADI, Y., Vivet-Boudou, V., Marquet, R. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotecnol.* 2007.

GIBELLINI, D. et al. Quantitative detection of human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *Journal of Virological Methods*, v. 115, p. 183-189, 2004.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v. 25, p. 386-401, 2001.

GOBERT, J. M. et al. Multiple-drug-resistant mutants of feline immunodeficiency virus selected with 2',3'-dideoxinosine alone and in combination with 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents and Chemoth.* v. 38, p. 861-864, 1994.

GUNSON, R.N., Collins, T.C., Carman, W.F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, v. 35, p. 355-367, 2006.

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.

HARRIGAN, Bloor, P.R, Larde,r S. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *J. Virol.*, v. 72, p. 3773-3778, 1998.

HARTMANN, K. & Sellon, R.K. Feline immunodeficiency virus infection. In Greene, C.E. (ed) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. WB Saunders, p.131-143, 2006.

HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet. J.*, v. 155, p. 123-37, 1998.

HARTMANN, K., Donath A., Beer B., et al. Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.35, p. 167-175, 1992.

IKEDA, Y. Et al. High genetic stability of TM1 and TM2 strains of subtype B feline Immunodeficiency virus in long-term infection. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 66, p. 287-289, 2004.

JORDAN, et al. Domestic cat model for predicting human nucleoside analogue pharmacokinetics in blood and seminal plasma. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 2173-2176, 2001.

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.

KELLAM, P. et al. Fifth mutation in human Immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 1934-1938, 1992.

KELLAM, P., Larder, B.A. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J. Virol.*, v. 69, p. 669-74, 1995.

KERVINEN, J., Lubkowski, J., Zdanov, A., Baht, D., Dunn, B.M., Hui, K.Y., Powel, D.J., Kay, J., Wlodawer, A., Gustchina, A. Toward a universal inhibitor of retroviral proteases: comparative analysis of the interactions of LP-130 complexed with proteases from HIV-1, FIV, and EIAV. *Protein Sci.*, v. 7, p. 2314-23, 1998.

KUMAR, S., Tamura, K., Nei, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* v. 5, p. 150-163, 2004.

LARA, V.M., Taniwaki, S. A., Araújo Jr, J. P. A clinico-epidemiological study on feline immunodeficiency virus in São Paulo. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, in press, 2006.

LARDER, B., Kemp, S.D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science*, v. 246, p. II55-II58, 1989.

LARDER, B.A., Darby, G. Richman, D.D. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, v. 243, p. 1731-1734, 1989.

LEUTENEGGER, C.M. et al. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantification by polymerase chain reaction using the TaqMan® fluorogenic real-time detection system. *Journal of Virological Methods*, v. 78, p. 105-116, 1999.

LIN, Y. C. Et al. Alteration of substrate and inhibitor specificity of feline immunodeficiency virus protease. *J. Virol.* v. 74, p. 4710-4720, 2000.

LIVAK, K.J, Schmittgen, D.T. Analysis of relative gene expression using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.

MATTEUCCI, D. et al. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p. 494-501, 1993.

MEDLIN, H. K. et al. Selection and characterization of a mutant of feline immunodeficiency virus resistant to 2',3'-dideoxycytidine. *Antiviral Agents and Chemoth.* v. 40, p. 953-957, 1996.

MIYAZAWA, T. et al. Infection of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Front. Biosci.* v. 7, p. 504-518, 2002.

NORTH, T.W. et al. Characterization of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 265, p. 5121-5128, 1990.

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.

PERELSON, A.S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, v. 271, p. 1582-1586, 1996.

PRESTON, B.D., Poiesz, B.J. Loeb, L.A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, v. 242, p. 1168-1171, 1988.

REARDON, J.E. et al. Human Immunodeficiency virus reverse transcriptase: steady-state and pre-steady-state kinetics of nucleoside incorporation. *Biochemistry*, v. 31, p. 4473-4479, 1992.

REMINGTON, K. M. et al. Mutants of feline immunodeficiency virus resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J.Virol.* v. 65, p. 308-312, 1991.

REMINGTON, K.M. et al. Rapid phenotypic reversion of zidovudine-resistant feline immunodeficiency virus without loss of drug-resistant reverse transcriptase. *J. Virol.*, v. 68, p. 632-637, 1994.

SHEEHY, N., Desselberger, U. Sequence analysis of reverse transcriptase genes of zidovudine (AZT)-resistant and -sensitive human immunodeficiency virus type 1 strains. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 223-228, 1993.

SAMBROOK, J; RUSSELL, W. D. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 8.1-8.126, 2001.

SMITH, N.R. et al. Effect of 3'-azido-2',3'-deoxythymidine (AZT) on experimental feline immunodeficiency virus infection in domestic cats. *Research in Veterinary Science*, v. 57, p. 220-224, 1994.

SMITH, R. A. et al. A novel point mutation at position 156 of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus confers resistance to the combination of (--)β-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Journal of Virology*. v. 72, p. 2335-2340, 1998.

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.

SOUZA, H.J.M., Teixeira, C.H.R., Graça, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clín. Vet.* v. 36, p. 14-21, 2002.

TANIWAKI, S.A, Araújo, Jr. J.P., Lara, V.M. Estudo da frequência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina pela nested-PCR. *Anais da 6<sup>a</sup> Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP*, p. 4-5, 2002.

WATZINGER, F. et al. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 254-298, 2006.

WEINSTOCK, H., Respress, R., Heneine, W. et al. Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drugs susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *J. Infect. Dis.*, v.182, p. 330-333, 2000.

ZHANG, W. Pharmacokinetics of zidovudine in cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 65, p. 835-840, 2004.

ZHU, Y. Q. et al. Mutants of feline immunodeficiency virus resistant to 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine. *Antimicrob. Agents and Chemoth.* v. 40, p. 1983-1987, 1996.

**INTERAÇÕES ENTRE O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)  
E AS CÉLULAS HOSPEDEIRAS: REVISÃO**

**INTERACTIONS BETWEEN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS (FIV)  
AND HOST CELLS: A REVIEW**

**RESUMO**

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é responsável pela síndrome da imunodeficiência dos gatos domésticos. O FIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e possui características morfológicas e estrutura protéica semelhante ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O FIV, bem como a infecção do seu hospedeiro natural, tem sido descrito como um modelo potencial para o estudo da infecção pelo HIV. Esta revisão teve por objetivo discorrer a respeito das interações entre o FIV e as células hospedeiras. Foram apresentadas as alterações desencadeadas pela presença viral desde a entrada do vírus no organismo hospedeiro até o estabelecimento da infecção. Também foram revisados os resultados e implicações obtidas da experimentação *in vitro* das relações vírus e células.

Termos de indexação: Vírus da Imunodeficiência felina, infecção, Crendell Feline Kidney Cells, linfócitos, receptores celulares.

**ABSTRACT**

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) causes a syndrome of immunodeficiency in domestic cats. FIV is classified as a member of the family *Retroviridae*, genus *Lentivirus*, and closely resembles the Human Immunodeficiency Virus (HIV) in morphology and protein structure. The virus, and its infection, is one of the most promising animal models for the infection of the HIV. This review discoursed regarding interactions between FIV and host cells. Unchained alterations by viral presence, since the virus entrance in the host until the establishment of infection, were presented. The results and implications obtained from *in vitro* experimentation on relationship between virus and cell were reviewed too.

Index terms: Feline Immunodeficiency Virus, infection, Crendell Feline Kidney Cells, lymphocytes, cellular receptors.

## **INTERAÇÕES ENTRE O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) E AS CÉLULAS HOSPEDEIRAS: REVISÃO**

A disseminação do FIV pelas células e tecidos do hospedeiro logo após sua entrada foi extensivamente estudado. A utilização de diferentes vias de inoculação, isolados virais e técnicas de detecção pode determinar pequenas diferenças nos resultados.

Obert e Hoover (2002), através de inoculação experimental pela via oral-nasal, demonstraram já nos primeiros 12 dias, a presença de células infectadas na mucosa, tonsilas e linfonodos regionais (faringeal, gástrico, mesentérico e traqueobrônquico). Essas células infectadas possuíam características de células dendríticas e células T. Não foram encontradas células epiteliais infectadas, sugerindo que os lentivírus atravessam as barreiras da mucosa por mecanismo independente desse tipo celular. Apesar de haver evidências que sugerem ser a habilidade em infectar macrófagos uma peça chave na transmissão do vírus via mucosa (van't Wout et al. 1994), nesse estudo foi mínima a infecção nessas células.

Nas primeiras semanas após inoculação o RNA viral pode ser encontrado em altas concentrações no plasma e soro (Diehl et al. 1995), o DNA proviral é detectado em células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) (Matteucci et al. 1993). Nos tecidos, após uma semana de infecção, tanto o RNA viral (Rogers et al. 2002) quanto o DNA proviral (Beebe et al. 1994) podem ser encontrados na medula óssea, timo e linfonodos. Matteucci et al. (1993) demonstraram que o único tecido não linfóide em que se pôde isolar o FIV na primeira semana após infecção é no tecido das glândulas salivares. Em órgãos não linfóides, o RNA viral foi encontrado em estágios mais tardios da infecção, mas somente no interstício, especialmente ao redor de vasos e locais de lesões inflamatórias (Beebe et al., 1994).

Após a disseminação nos diversos tecidos, o FIV pode ser encontrado em diversos tipos celulares, sendo caracterizado como o lentivírus com maior tropismo celular. O FIV foi isolado de linfócitos B (Dean et al. 1996), de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Brown et al. 1991), macrófagos (Rogers et al. 2002), astrócitos (Denave et al. 1994) e megacariócitos (Beebe et al. 1994).

Além da experimentação *in vivo*, grande parte do conhecimento a respeito da replicação e cinética do FIV foi obtida através de infecção e passagem em células aderentes. Foi estabelecida a infecção persistente em algumas linhagens celulares felinas como as células epiteliais renais “Crendell Feline Kidney Cells” (CrFK) (Phillips et al. 1990) e células linfóides T TFL-4 (Richardson et al. 1999). Outros tipos celulares também foram utilizados *in vitro* como FeL-039 (Tokunaga et al. 1992), MYA-1 (Myiazawa et al., 1989), FCD4D e FCD8D (English et al. 1993), 104-CI (De Perseval et al. 2004a), células de linfoma felino 3201 (De Perseval 2004a), macrófagos (Brunner et al. 1989) e astrócitos G355-5 (Phillips et al. 1990) .

As alterações celulares causadas pela presença do FIV podem variar de acordo com o isolado viral e o tipo celular. Em células linfóides o efeito citopático (ECP) normalmente se torna evidente de 7 a 14 dias após infecção e inclui arredondamento celular, formação de sincício e lise (Pedersen et al. 1987). A formação de sincício ocorre quando a proteína do envelope viral expressa na membrana da célula infectada entra em contato com uma célula adjacente expressando o receptor e co-receptor específicos virais, o que promove a fusão das membranas (Doms & Moore, 2000).

Denave et al. (1994) demonstraram que a infecção pelo FIV Petaluma (FIV-A), em células da astróglia com formação de ECP e em CrFK onde não foi observado ECP, promoveu a redução do potencial de membrana mitocondrial (MMP) e das junções

intercelulares *gap* de comunicação (GJIC). Alterações no MMP causam a disfunção da geração de energia para que a célula mantenha a homeostase e a redução das junções *gap* determina alterações do transporte de íons e micromoléculas entre células adjacentes. Os autores não esclareceram a contribuição das alterações encontradas para a formação de ECP.

Dowling & Bienzle (2005) estudaram a influência do FIV sobre a expressão dos genes celulares. A amostra viral FIV Petaluma (clade A) promoveu a alteração de 132 genes em CrFK, enquanto a amostra primária (PI), UsgaB01 (clade B), alterou a expressão de 24 genes em linfócitos. A maioria das mudanças de expressão genética ocorreu nas primeiras 4h após infecção, sendo mais comum a elevação da expressão do que a diminuição.

O evento inicial da entrada do vírus na célula alvo é a interação do vírus com o receptor de membrana celular e a especificidade desta interação determina o tropismo viral (Willet et al. 2006). Os clones derivados do isolado FIV Petaluma p34TF10 e FIV-14 são capazes de infectar CrFK e astrócitos G355-5, enquanto os isolados FIV PPR e FIV TM1 (isolados primários, PI) infectam linfócitos e outras células da linhagem T, mas não infectam CrFK ou G355-5 (Philips et al. 1990). Na tentativa de especificar o receptor utilizado pelo FIV para promover a fusão de membranas, Poechla & Looney (1998), demonstraram que o receptor de quimiocina CXCR4 humano promoveu a infecção e fusão de membrana do clone FIV 34TF10 (CrFK-trópico). Em 1999, Richardson et al. (1999) utilizaram mecanismo de bloqueio de receptores para avaliar a capacidade de diferentes isolados virais em infectar células. O fator derivado de célula do estroma  $1\alpha$  (SDF- $1\alpha$ ) é um ligante natural do receptor CXCR4. A presença de SDF- $1\alpha$  inibiu a infecção de isolados PI

em PBMC com menor eficiência do que a inibição de FIV CrFK-trópico em CrFK. Isso demonstra a existência de mais de um fator determinante da entrada de FIV PI em células.

Em outro experimento, FIV-PPR (PI), primeiramente, falhou em infectar produtivamente células CrFK e outras células não-linfóides (que expressam CXCR4), mas se adaptaram a replicar nessas células após várias passagens *in vitro*. Os vírus adaptados demonstraram fenótipo marcadamente diferente do vírus parental, incluindo a habilidade de infectar linhagens celulares previamente refratárias, indução de sincício e propriedades cinéticas aceleradas (Lerner & Elder, 2000).

Intrigados com o compartilhamento de CXCR4 entre lentivírus humano e felino apesar de este último não utilizar o receptor primário do HIV, CD4 (Hosie et al. 1993), De Perseval & Elder (2001) propuseram que, assim como ocorre com o HIV, a ligação do vírus PI deve seguir um modelo composto por dois estágios. No primeiro, a glicoproteína de superfície deve se ligar a um receptor (semelhante ao CD4 na infecção pelo HIV) induzindo rearranjos conformacionais que promovem o segundo estágio, a ligação da glicoproteína de superfície com CXCR4. Prosseguindo, esses mesmos pesquisadores, descobriram que uma molécula de superfície celular de 43-kDa, expressa em células PBMC possui afinidade para ligação da proteína de superfície viral.

Em 2004, Shimojima et al. identificaram a proteína de 43-kDa como o antígeno celular CD134 ativador de células T, pertencente à família de receptores dos fatores de necrose tumoral. Neste mesmo ano, De Perseval et al., demonstraram a ligação direta da proteína de superfície viral com o receptor CD134, confirmando o seu papel como um receptor primário. Além disso, encontraram um outro tipo de receptor envolvido no processo de ligação, o “heparan sulfato proteoglycans” (HSPGs). HSPGs são expressas em

grande variedade de células mas predominam em células epiteliais (CrFK) e astrócitos (De Perseval & Elder, 2001).

Assim, amostras adaptadas ao crescimento em CrFK utilizam os HSPGs como facilitadores da ligação entre a glicoproteína do envelope e a membrana celular (De Perseval & Elder, 2001) e as amostras virais primárias utilizam o receptor CD134 para a ligação, entretanto, a entrada de ambos os variantes virais é mediada pelo receptor CXCR4 (Rishardson et al. 1999, De Perseval & Elder, 2001, De Perseval et al. 2004a).

Além da ligação a receptores específicos, outros mecanismos podem estar envolvidos no tropismo tecidual apresentado pelas amostras virais. Alguns deles envolvidos nos primeiros estágios da infecção, incluindo ligação ao receptor, fusão, entrada e integração pró-viral, como também fatores transcricionais e pós-transcricionais, como tradução dos mRNA virais, empacotamento e liberação dos vírions infectivos (Pancino et al. 1995). Para o HIV-1, já está estabelecido que a glicoproteína do envelope viral determina o reconhecimento ao receptor celular, ligação e fusão de membrana e que a diversidade genética do gene *env* entre as diferentes amostras levam a tropismo celulares distintos. Investigando o tropismo celular do FIV, Pancino et al. (1995) compararam a eficiência de ligação e infecção de duas amostras, FIV 34TF10 (CrFK-trópico) e FIV PPR (PI), que possuem 13% de divergência na sequência de aminoácidos das proteínas do envelope (Philips et al. 1990). Somente os mutantes expressando o gene *env* CrFK-trópico foram capazes de induzir infecção ativa em CrFK, os mutantes expressando o gene *env* PI foram processados corretamente nas CrFKs, após transfecção, mas não foram capazes de promover infecção ativa nestas células, mas somente em células T co-cultivadas.

Novamente, para o HIV-1, a região V3 altamente variável do gene *env* é um importante determinante do tropismo celular e capacidade de indução de ECP. A transferência do fragmento V3 e somente deste, do isolado FIV-AM6c (CrFK-tropical) para o isolado 19KI (PI) tornou possível a infecção deste último. Durante o experimento, o mutante viral se replicava ativamente nas células por somente 52 dias, entretanto, após algum tempo, os vírus se tornaram altamente adaptados, pelo acúmulo de mutações que o transformaram em uma forma viral totalmente adaptada. A mutação que conferiu esta adaptação viral foi a aquisição de lisina nas posições 407 e 409 na proteína SU (gp120) (Sieberlink et al. 1995, Verschoor et al. 1995). Por outro lado, Vahlenkamp et al. (1997) encontraram que uma única mutação levando à substituição de metionina por treonina na posição 751 do domínio externo da glicoproteína transmembrana (TM) alterou o tropismo celular. Em 2000, Lerner & Elder encontraram alterações de aminoácidos que ditavam o fenótipo viral, tanto em SU quanto TM. Está claro que, tanto a proteína SU quanto TM, participam do evento de entrada viral.

Aprofundando o estudo sobre a participação da TM durante a fusão viral, Medinas et al. (2002) desenvolveram peptídeos que, quando ligados aos domínios da gp40 (TM), bloqueavam a fusão viral. Foram desenhados peptídeos para a ligação na região “heptad repeat 2” (HR2), região sabidamente com bloqueio da fusão do HIV-2, mas obtiveram apenas certo grau de inibição. Garg et al. (2004) também com peptídeos de bloqueio, demonstraram que o fator limitante da fusão viral não é a gp40 e sugeriram que uma região pré-transmembrana rica em triptofanos, conservada entre os lentivírus e alguns isolados de FIV, está envolvida no processo de fusão, pois essa região hidrofóbica promoveria a junção dos componentes lipídicos das membranas viral e celular. Para estes autores, a fusão e entrada na célula, pela amostra PI FIV-NCSU<sub>1</sub>, segue os seguintes estágios: ligação da

proteína gp95 ao receptor e co-receptor, seguida de mudanças conformacionais na proteína que resulta na exposição dos domínios triméricos “heptad repeats” (RH1 e RH2) da gp40 formando uma hélice sextupla e, finalmente, a região pré-TM desempenha a função crítica de fundir as membranas lipídicas.

É importante relacionar o curso da doença juntamente com as células afetadas e os receptores envolvidos. De Perseval et al. (2004b) demonstraram *in vitro*, que somente células expressando o receptor CD134 desenvolveram infecção produtiva e que células PBMC inativas não expressam este receptor. Na população de linfócitos, após estimulação com IL-2 e Com-A, especificamente linfócitos T CD4 tiveram os níveis de CD134 aumentados. Este achado está em concordância com a elevada infecção neste grupo de linfócitos apresentada durante a fase aguda *in vivo*.

*In vitro*, De Perseval et al. (2004b) encontraram diferenças entre a ligação da glicoproteína SU a células T CD8 em comparação com células T CD4. As células T CD8 ativadas não expressaram o receptor CD134, mas expressaram o co-receptor CXCR4. A interação da SU com essas células foi promovida diretamente pelos receptores CXCR4 e HSPG. Entretanto, essa interação não foi suficiente para promover infecção produtiva do isolado primário FIV-PPR em células T CD8, confirmando que a ligação ao receptor CD134 é um pré-requisito para a infecção de isolados PI. Neste estudo, a especificidade por células T CD4 ativadas demonstrada pelo FIV está em concordância com o que ocorre *in vivo*, onde células T CD4 são predominantemente infectadas pelo FIV na primeira fase da infecção. Entretanto, tardiamente, tanto células T CD8 quanto B são infectadas (Dean et al. 1996). Observando-se que a expressão de CXCR4 é amplamente distribuída e que vírus adaptados ao crescimento em cultura utilizam diretamente este receptor, Lerner & Elder (2000) propuseram que o tropismo celular do FIV incluindo células T CD 8 e B pode ser o

resultado da adaptação do vírus de um fenótipo dependente de CD134 para um não dependente.

Em um estudo mais recente, Willet et al. (2006) encontraram que o isolado viral FIV PPR (clade A) requer menor complexidade de ligação ao receptor CD134 para que ocorra a infecção celular, quando comparado aos isolados FIV GL8 (clade A) e CPGammer (clade C). FIV PPR já demonstrou ser capaz de infectar células na ausência de CD134 quando a expressão de CXCR4 está aumentada (De Perseval et al. 2004a). Esses autores sugeriram que isolados virais que requerem menor complexidade de ligação ao CD134 possuem a capacidade de se adaptarem mais facilmente ao cultivo em células que não expressam esse receptor e que, *in vivo*, o surgimento de variantes virais com esse fenótipo pode ser acompanhado da expansão do tropismo observado na mudança da fase aguda para a fase crônica da infecção (English et al. 1993, Dean et al. 1996).

Pacientes com HIV-1 em fase terminal (AIDS) apresentam variantes virais com capacidade de infectar células na ausência do receptor primário CD4 (Edwards et al. 2001) Em concordância, estudos com variantes do FIV isolados de animais apresentando sinais clínicos de AIDS ou de cultivo celular prolongado demonstram um fenótipo viral capaz de promover infecção celular sem a utilização do receptor CD134 (Philips et al. 1990). Essas variantes apresentam maior susceptibilidade a anticorpos neutralizantes e por isso só devem aparecer em animais com o sistema imune já comprometido pela doença (Willet et al. 2006).

Considerando-se que o FIV possui o característico tropismo por células de defesa imunológica, é importante relacionar a infecção viral e suas implicações patológicas. É interessante observar que, a replicação viral é dependente tanto das proteínas regulatórias virais quanto celulares, então o grau de transcrição viral é marcadamente influenciado pelo

grau de transcrição da célula infectada. Assim, o vírus se torna dependente da ativação celular, mas induz a ativação do sistema imune contra si.

A ativação antígeno-específica de linfócitos T requer a simultânea estimulação do receptor celular ao antígeno apresentado por APCs e sinais co-estimulatórios (segundo sinal), também presentes em APCs, que transformam a célula em repouso permissiva à infecção produtiva. A ativação mediada pelos antígenos leva ao aumento da expressão de fatores regulatórios e à transição dos linfócitos da fase inativa G0 para a fase G1 do ciclo celular. A co-estimulação, por exemplo, com o receptor CD28, resulta na liberação de IL-2, expressão de receptor para IL-2 e o progresso da fase G1 para S, conseqüentemente ocorrendo mitose (Fu & Taylor, 1992). Na ausência da co-estimulação, as células que encontram antígenos não progridem para o estágio de ativação e são eliminadas por apoptose ou entram em estado de não-resposta ou anergia (Abbas & Lichtman, 2005). A estimulação celular via sinais que mimetizam a ligação específica do antígeno, como lecitinas vegetais Concanavalina A (ConA) ou Fitohemaglutinina (PHA), também promovem mudanças marcantes na expressão gênica, na ativação de fatores de transcrição, progresso do ciclo celular e expressão de moléculas na superfície que tornam a célula altamente permissiva à infecção viral (Joshi et al. 2004). Esse tipo de estimulação é utilizado em experimentação *in vitro* para promover a infecção viral.

Similar a outras infecções virais, a causada pelo FIV promove resposta imune celular e humoral, que suprimem a replicação viral (Beatty et al. 1996). Entretanto, o vírus não é eliminado completamente do hospedeiro, causando infecção persistente com decréscimo gradual de células T CD4 auxiliaadoras e imunodeficiência (Hoffmann-Fezer et al. 1992).

Mecanismos imunes naturais estão envolvidos no decréscimo de células T CD4, mas é interessante relacionar os efeitos diretos da presença do FIV e a patogenia que ele promove. Há diversos estudos que demonstram o aumento da ocorrência de apoptose em células T de gatos infectados. A apoptose é um processo de morte celular programada natural que regula o desenvolvimento do repertório celular ao longo da vida de um organismo e é iniciado pela ligação de receptores específicos da superfície celular com seus respectivos ligantes, por exemplo: Fas e FasL, receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ R) e TNF- $\alpha$  e B7 com o receptor 4 de linfócito T citotóxico (CTL4) (Tompkins et al., 2002). Ohno et al. (1993) demonstraram que TNF- $\alpha$  induziu modificações morfológicas em CrFK cronicamente infectadas por FIV antes mesmo de 3h de cultivo. Características do processo de apoptose como encolhimento celular e condensação de cromatina foram observados após 48h de cultivo. Em CrFK não infectadas a aplicação de TNF- $\alpha$  não afetou a morfologia nem a viabilidade das células. O motivo da seletiva destruição de células infectadas permaneceu desconhecido.

Lawrence et al. (1995) demonstraram que, na fase crônica da infecção pelo FIV, ocorrem mudanças na produção de citocinas como a diminuição de IL-2 e concomitante aumento da produção de TNF- $\alpha$ . Por outro lado, Dowling & Bienzle (2005), estudando a expressão dos diferentes genes em células infectadas, CrFK e linfócitos, encontraram alterações em 132 e 24 genes, respectivamente. Entre esses genes, somente o fator pró-apoptótico YAP-65 estava aumentado. Resultados contraditórios dificultam a determinação do papel do FIV na expressão de genes apoptóticos.

Os pesquisadores encontraram resultados consistentes a respeito da apoptose induzida pelo complexo B7-CTL4 como consequência da infecção viral. A família de moléculas co-estimulatórias B7 são encontradas naturalmente em células apresentadoras de

antígeno e estas moléculas interagem com os receptores CD28 e CTL4 em linfócitos para promover o segundo sinal necessário à ativação destas células. B7.1 e B7.2 inicialmente se ligam ao CD28 promovendo sinais para a sobrevivência e proliferação celulares induzindo a secreção de IL-2, proliferação de linfócitos e o desenvolvimento da resposta imune. Se não houver o segundo sinal, após a ligação APC-linfócito via receptores específicos, a célula T se torna não-responsiva ou anérgica e progride para apoptose. Linfócitos ativados podem se tornar anérgicos e serem eliminados por apoptose ou outro mecanismo, ou seja, a ligação de B7 a CTL4. Ao contrário de CD28, CTL4 é expresso somente depois que a célula é ativada. A ligação de B7 com CTL4 desencadeia sinais negativos suprimindo a produção de IL-2 e conseqüentemente a proliferação, resultando em anergia e apoptose (Abbas & Lichtmann, 2005). Devido às moléculas B7.1 e B7.2 serem 20 a 100 vezes mais ávidas por CTL4 do que por CD28, sinalização negativa deve predominar em meio a células ativadas, determinando assim a regressão da resposta imune. A ligação de B7 a CD28 e CTL4 mantém o balanço entre ativação/proliferação de linfócitos T e apoptose, um processo importante na regulação da resposta imune adquirida (Tompkins et al. 2002).

Apesar das moléculas B7 serem expressas normalmente em APCs, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, Tompkins et al. (2002) e Bull et al. (2004) demonstraram que células T nos linfonodos e em menor grau no sangue, de gatos infectados com FIV apresentam grande expressão de molécula B7. Aparentemente essas células T expressando B7 atuam como células apresentadoras de antígeno. Entretanto, essa apresentação de células T a células T não induz à produção de IL-2 nem a proliferação celular, mas promovem a anergia e apoptose após interação dessas células a APCs naturais. Os pesquisadores sugerem que o decréscimo progressivo de linfócitos T CD4 e conseqüente perda da função imune durante a infecção pelo FIV resultam do estado de

ativação crônica, causado pelo FIV, desses tipos celulares que induz ao aumento da expressão de B7 e CTL4 e que a interação dos linfócitos apresentando esse fenótipo leva ao aumento de anergia e apoptose (Tompkins et al. 2002).

O FIV pode se ligar a linfócitos e não promover o nível de ativação que geralmente é necessário para desencadear a expressão dos sinais clássicos de ativação, proliferação e apoptose. Joshi et al. (2004) demonstraram que linfócitos com infecção ativa apresentaram na superfície, o marcador de ativação celular CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2) enquanto linfócitos com infecção latente não expressaram esse marcador. O mecanismo que desencadeia esse processo ainda não está totalmente esclarecido, mas Hohdatsu et al. (2003) demonstraram que fatores solúveis produzidos por células T CD8 durante a infecção suprimem a replicação viral em células T CD4 por um mecanismo de bloqueio da transcrição de mRNA e conseqüentemente inibem a expressão de proteínas virais e celulares na superfície celular. Células T CD4 infectadas escapam dos processos de lise e apoptose natural carregando o vírus de forma latente. Por outro lado, Joshi et al. (2005) afirmaram que parte dos linfócitos T CD4 infectados que apresenta o marcador de ativação possui a característica de resistir à morte celular programada e que, na presença de IL-2, suporta a replicação viral. Esse tipo celular seria responsável pelo reservatório de infecção ativa de vírus em um microambiente com persistente liberação de citocinas, como no tecido linfóide.

O FIV, bem como a infecção do seu hospedeiro natural, tem sido descrito como um modelo potencial para o estudo da infecção pelo HIV. Esses vírus compartilham semelhanças no que diz respeito à patologia que induzem nos respectivos hospedeiros. Entretanto, somente o HIV-1 utiliza a molécula CD4 como receptor primário para infecção, enquanto que ambos os vírus promovem o decréscimo específico de células T CD4. A

razão pela qual esta população de células é seletivamente diminuída é intrigante quando consideramos que o FIV apresenta tropismo celular mais amplo que o HIV (De Perseval et al. 2004). O estudo do FIV tem crescido nos últimos anos e pode trazer informações importantes em várias áreas de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A.K., Lichtman A.H. 2005. *Imunologia celular e molecular*, p.580, 5ª ed. Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro.

Beatty J.A. et al. 1996. A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J. Virol.* 70:6199-6206.

Beebe A. M. et al. 1994. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J. Virol.* 68:3080-3091.

Brown W.C. et al. 1991. Feline immunodeficiency virus infects both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Virol.* 65:3359-3364.

Brunner D., Pedersen N. 1989. Infection of peritoneal macrophages in vitro and in vivo with feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 63:5483-5488.

Bull M.E. et al. 2004. Spontaneous T cell apoptosis in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats is inhibited by IL2 and anti-B7.1 antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99 :25-37.

Danave I.R. et al. 1994. Feline immunodeficiency virus decreases cell-cell communication and mitochondrial membrane potential. *J. Virol.* 68:6745-6750.

De Perseval A., Elder J.H. 2001. Binding of recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoprotein to feline cells: role of CXCR4, cell-surface heparans, and an unidentified non-CXCR4 receptor. *J. Virol.* 75:4528-4539.

De Perseval A. et al. 2004a. Factors that increase the effective concentration of CXCR4 dictate feline immunodeficiency virus tropism and kinetics of replication. *J. Virol.* 78 :9132-9143.

De Perseval A. et al. 2004b. Feline immunodeficiency virus targets activated CD4<sup>+</sup> T cells by using CD134 as a binding receptor. *PNAS.* 101:13044-13049.

Dean G.A. et al. 1996. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph-node. *J. Virol.* 70:5165-9.

Diehl, L.J. et al. 1995. Longitudinal assessment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of quantitative competitive reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* 69:2328-2332.

Doms R.W., Moore J.P. 2000. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *The Journal of Cell Biology.* 151:9-13.

Dowling R.J.O., Bienzle D. 2005. Gene-expression changes induced by feline immunodeficiency virus infection differ in epithelial cells and lymphocytes. *Journal of General Virology*. 86:2239-2248.

Edwards T.G. et al. 2001. Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a human immunodeficiency type 1 envelope protein. *J. Virol.* 75:5230-5239.

English R.V. et al. 1993. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67:5175-5186.

Fu T-B, Taylor J. 1992. When retroviral reverse transcriptases reach the end of their RNA templates. *J. Virol.* 66:4271-4278.

Garg H. et al. 2004. Mechanism of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated fusion. *Virology*. 321:274-286.

Hoffmann-Fezer et al. 1992. Decline in CD4 cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 66:1484-1488.

Hohdatsu T. et al. 2003. Ability of CD8<sup>+</sup> T cell anti-feline immunodeficiency virus activity correlated with peripheral CD4<sup>+</sup> T cell counts and plasma viremia. *Microbiol. Immunol.* 47:765-773.

Hosie M.J. et al. 1993. A monoclonal antibody which blocks infection with feline Immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J. Virol.* 67:1667-1671.

Joshi A. et al. 2005. Different thresholds of T cell activation regulate FIV infection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *Virology*. 335:212-221.

Joshi A. et al. 2004. Preferential replication of FIV in activated CD4(+)CD25(+)T cells independent of cellular proliferation. *Virology*. 321:307-322.

Lawrence C.E. et al. 1995. Cytokine response by cats infected with feline immunodeficiency virus: a longitudinal study. *Immunology*. 85:568-574.

Lerner D.L., Elder J.H. 2000. Expanded host cell tropism and cytopathic properties of feline immunodeficiency virus strain PPR subsequent to passage through interleukine-2-independent T cells. *J.Virol.* 74:1854-1863.

Matteucci D. et al. 1993. Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:494-501.

Medinas R.J. et al. 2002. C-terminal gp-40 peptide analogs inhibit feline Immunodeficiency virus: cell fusion and virus spread. *J. Virol.* 76:9079-9086.

- Miyazawa T. et al. 1989. Establishment of a feline T-lymphoblastoid cell line highly sensitive for replication of feline immunodeficiency virus. *Arch. Virol.* 108:131-135.
- Obert L.A & Hoover E.A. 2002. Early pathogenesis of transmucosal feline immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 76:6311-6322.
- Ohno K. et al. 1993. Apoptosis induced by tumor necrosis factor in cells chronically infected with feline Immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67:2429-2433.
- Pancino G. et al. 1995. Differences in feline Immunodeficiency virus host cell range correlate with envelope fusogenic properties. *Virology.* 206:796-806.
- Pedersen N. C. et al. 1987. Isolation of a T-Lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science.* 235:790-3.
- Philips T.R., Talbott R.L. 1990. Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus. *J.Virol.* 64:4605-4613.
- Poeschla E. M., Looney D. J. 1998. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. *J. Virol.* 72:6858-66.
- Richardson J. et al. 1999. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by primary and laboratory-adapted strains of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 73:3661-3671.
- Rogers A.B., Mathiason C.K., Hoover E.A. 2002. Immunohistochemical localization of feline immunodeficiency virus using native species antibodies. *American Journal of Pathology.* 161:1143-1151.
- Shimajima M. et al. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline Immunodeficiency virus. *Science.* 303:1192-1195.
- Siebelink K.H.J. et al. 1995. A determinant of feline immunodeficiency virus involved in Crandell feline kidney cell tropism. *Vet. Immunol. Immunopath.* 46 :61-69.
- Tokunaga K. et al. 1992. Alters cell tropism and cytopathicity of feline immunodeficiency virus in two different feline CD4-positive, CD8-negative cell lines. *J. Virol.* 66:3893-3898.
- Tompkins M.B. et al. 2002. Feline immunodeficiency virus infection characterized by B7<sup>+</sup>CTL4<sup>+</sup> T cell apoptosis. *The Journal of Infectious Disease.* 185:1077-1093.
- Vahlenkamp T.W. et al. 1997. A single amino acid substitution in the transmembrana envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus alters cellular tropism. *J. Virol.* 71:7136-7135.

Van't Wout A.B. et al. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest.* 94:2060-2067.

Vershoor E.J. et al. 1995. A single mutation within the V3 envelope neutralization domain of feline immunodeficiency virus determines its tropism for CrFK cell. *J. Virol.* 69:4752-4757.

Willet B.J. et al. 2006. Differential utilization of CD134 as a functional receptor by diverse strains of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 80:3386-3394.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)