

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO NO GENE DA
APOBEC3H DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA**

FERNANDA LUZ DE CASTRO
Bacharel em Biologia

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO NO GENE DA
APOBEC3H DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA**

FERNANDA LUZ DE CASTRO
Bacharel em Biologia

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro de 2014

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO NO GENE DA APOBEC3H DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA

Autora: Fernanda Luz de Castro

Orientadora: Ana Cláudia Franco

RESUMO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV), pertencem à família *Retroviridae*, são amplamente distribuídos e induzem um efeito imunossupressor significativo em gatos domésticos (*Felis catus*) infectados. Proteínas que apresentam atividade contra os retrovírus são conservadas entre mamíferos e são denominadas de fatores de restrição. As citidinas deaminases da família de genes *APOBEC3* são a classe mais estudada de fatores de restrição e o gene *APOBEC3H* (*A3H*) codifica duas proteínas (*APOBEC3H* e *APOBEC3CH*). Essas proteínas de felinos são os principais responsáveis pela restrição de FIV e FeLV, o que ocorre por meio de hipermutações geradas nos provírus durante a transcrição reversa. Alterações na sequência desse gene podem alterar a estabilidade e a localização celular de proteínas *APOBEC3H* em mamíferos. Considerando a importância do gene *A3H* em gatos, a investigação de sua variabilidade é relevante. Cinquenta amostras de DNA de gatos FIV e/ou FeLV positivos e cinquenta e nove amostras de gatos negativos para ambos os vírus foram usadas para amplificar duas regiões diferentes do gene, com posterior seqüenciamento e análise comparativa das sequências. A primeira região investigada demonstrou-se conservada entre todas as amostras. Na segunda, foi possível identificar seis pontos de variação de nucleotídeos únicos, e um deles, o A65S (A65I) foi significativamente correlacionado com a suscetibilidade à infecção por FIV e/ou FeLV. Por outro lado, a análise de haplótipos mostrou que a combinação "GGGGCC" foi significativamente correlacionada com a ausência de infecção retroviral, talvez indicando um efeito protetor. Considerando que um polimorfismo na posição 65 já foi encontrado no Tigre da Indochina e dada a correlação encontrada nesta pesquisa, mais estudos sobre o efeito desses polimorfismos na atividade de fatores de restrição codificados pelo gene *A3H* devem ser realizados. Da mesma forma, investigações a respeito dos efeitos da combinação "GGGGCC" devem ser realizadas de modo a corroborar um possível efeito protetor sugerido no presente trabalho.

ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE *APOBEC3H* GENE OF DOMESTIC CATS (*Felis catus*) AND THEIR ASSOCIATION WITH THE SUSCEPTIBILITY TO FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND FELINE LEUKEMIA VIRUS INFECTIONS

Author: Fernanda Luz de Castro

Supervisor: Ana Cláudia Franco

ABSTRACT

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and the Feline Leukemia Virus (FeLV) belong to the *Retroviridae* family, are widely distributed and induce a significant immunosuppressive effect in infected domestic cats (*Felis catus*). Proteins with activity against retroviruses are conserved between mammals and determined as restriction factors. Cytidine deaminases of the *APOBEC3* gene family are the most studied class of restriction factors and the *APOBEC3H* gene encodes two proteins (APOBEC3H and APOBEC3CH) that are the most responsible for this restriction among cats, through hypermutations in provirus DNA during reverse transcription. Changes on the gene sequence can alter the stability and cellular localization of homologous proteins to APOBEC3H in mammals. Considering the importance of *APOBEC3H* gene in cats, the investigation of its variability is relevant. Fifty DNA samples of cats FIV and/or FeLV positives and fifty-nine of negative cats to both viruses were used as template to amplify two different regions of the gene, with subsequent sequencing and analysis. The first investigated region was conserved among all samples. On the second one it was possible to identify six single nucleotide variation points, and of them, the A65S (A65I) was significantly correlated with the susceptibility to FIV and/or FeLV infection. On the other hand, the haplotype analysis showed that the combination "GGGGCC" was significantly correlated with the lack of retroviral infection, maybe indicating a protective effect. Whereas a polymorphism at position 65 have been found in Indochinese Tiger and given the correlation found in this research, more studies about the effect on the activity of restriction factors encoded by the A3H gene should be performed. Similarly, research about the effects of the combination "GGGGCC" should be carried so that we can confirm a possible protective effect shown in this work.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao trio fantástico com que divido cada um dos meus dias em casa, a minha família:

Minha mãe, Maria da Graça Luz de Castro, meu exemplo de ser humano, a estrela a guiar o meu caminho em noite escura, minha força quando eu não conseguia me erguer sozinha. Mãe, amiga e companheira de caminhada, não existem palavras para dizer o quanto tu és importante na minha vida. Tenha certeza de que se eu alcancei mais essa vitória, muito foi devido ao teu ensinamento de jamais desistir de lutar.

Meu irmão, Alexandre Luz de Castro, meu modelo de profissional. Muito obrigada pelas correções e pelos momentos em que tu me ouviste e me auxiliaste. Desde pequeno, meu amigo, herói e professor.

A minha segunda mãe, Judith Cardoso Vieira (Dada), que me pegou no colo quando era menor, mas até hoje me envolve nos braços quando me sinto sem forças para continuar. Obrigada por secar minhas lágrimas e dizer que tudo daria certo... E veja só, no fim realmente funcionou.

Em segundo lugar, agradeço aos meus amigos, a família que a vida me possibilitou escolher. Se não fossem as constantes injeções de ânimo de cada um de vocês na minha vida, principalmente em cada final de semana desses dois anos de caminhada, eu certamente não teria chegado até aqui com tanta determinação. São muitos os nomes para citar aqui, mas penso que não seja necessário, pois cada um que se encaixa nessa descrição tem absoluta certeza disso. Cada um de vocês ocupa um pedaço precioso, único e insubstituível do meu coração. O amor de vocês é fundamental, nunca esqueçam disso. Obrigada por me amarem e me aceitarem, é graças a vocês que sou o que sou.

Em terceiro lugar, meus colegas de trabalho. Foi a companhia e o esforço de vocês que fez com que de cada minuto na bancada e cada hora demorada na frente da tela do computador valesse a pena. Obrigada pelos cafés da tarde e pelas piadas e histórias no meio do expediente. Sem dúvida vocês do LabVir foram a melhor equipe com que já trabalhei até então, e terei muitas saudades. Aproveito para agradecer aqui também os parceiros do grupo de pesquisa em HIV da FEPPS, que foram fundamentais para elaboração desse trabalho.

Em quarto lugar, mas muito importante, minha orientadora. Obrigada Ana Cláudia Franco, pela oportunidade, pelo voto de confiança, pela parceria e por todo o auxílio e disposição. Sem dúvida eu não poderia desejar uma orientadora melhor, tu és uma profissional completa.

E por fim, agradeço ao apoio financeiro da CAPES e da FINEP, que fizeram com que todo esse trabalho de fato saísse apenas do papel.

SUMÁRIO

	Página
1.Introdução.....	11
2.Revisão Bibliográfica	
2.1 Vírus da imunodeficiência felina (FIV).....	13
2.2 Vírus da leucemia felina (FeLV).....	18
2.3 Fatores de Restrição.....	24
2.4 Genes e proteínas APOBEC3.....	25
2.5 Gene APOBEC3H.....	29
3.Justificativa.....	32
4.Objetivos.....	33
5.Materiais e métodos	
5.1 Amostras de sangue de felinos.....	34
5.2 Determinação de polimorfismos no gene A3H de felinos.....	34
5.3 Análise dos genótipos dos haplótipos encontrados na população de estudo.....	37
5.4 Análise estatística.....	38
6.Resultados	
6.1 Determinação dos polimorfismos no gene A3H felino.....	38
6.2 Análise da correlação dos alelos e dos genótipos com a susceptibilidade à infecção por retrovírus.....	43
6.3 Análise dos haplótipos encontrados na população correlacionando com a susceptibilidade à infecção por retrovírus.....	46
7.Discussão.....	48
8.Conclusões.....	52
9.Referências.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Estudos sobre a prevalência de infecções por FIV na América do Sul.....	14
Tabela 2 Estágios da infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV).....	20
Tabela 3 Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das duas diferentes regiões do gene <i>A3H</i> e respectivos tamanhos dos produtos.....	35
Tabela 4 Volumes e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de amplificação das duas regiões do gene <i>A3H</i> de felinos.....	36
Tabela 5 Quantidades e frequências dos genótipos encontrados em cada um dos polimorfismos dentro da população de animais estudada.....	43
Tabela 6 Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FIV e/ou FeLV positivos e negativos.....	44
Tabela 7 Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FIV positivos e negativos.....	45
Tabela 8 Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FeLV positivos e negativos.....	45
Tabela 9 Os dez haplótipos encontrados na população de estudo e suas respectivas frequências dentro dos grupos.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Organização genômica do vírus da imunodeficiência felina (FIV).	17
Figura 2: Organização genômica do vírus da leucemia felina (FeLV)	22
Figura 3: Ilustração esquemática da ação dos fatores de restrição durante a replicação dos lentivirus de primatas	25
Figura 4: Ilustração esquemática dos genes <i>A3</i> nos mamíferos indicados.....	28
Figura 5: Representação da região genômica <i>APOBEC3</i> em felinos e seus respectivos transcritos.....	31
Figura 6: Amplificação das duas regiões de interesse do gene <i>A3H</i> de felinos.....	39
Figura 7: Alinhamento parcial de 313 nucleotídeos amplificados da região 1 do gene <i>A3H</i> de diferentes amostras.....	40
Figura 8: Alinhamento parcial de algumas sequências obtidas da região 2 do gene <i>A3H</i> de felinos representando os seis polimorfismos encontrados).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A - Adenina

AID - Deaminase induzida por ativação

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APOBEC1 - Sigla de *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1*

APOBEC2 - Sigla de *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2*

APOBEC3 (A3) – Sigla de *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3* (em português: apolipoproteína B de edição de RNA 3)

APOBEC4 - Sigla de *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 4*

A3Z3 – Nomenclatura alternativa de A3H em felinos.

A3Z2-Z3 – Único gene membro da família APOBEC3 em roedores

A3Z2a, A3Z2b, A3Z2c – Nomenclatura alternativa de A3Ca até A2Cc em felinos.

A94T - Troca de um aminoácido Alanina para Treonina no resíduo 94

BLAST – sigla de *Basic Local Alignment Search Tool*

C - Citosina

CA – Gene codificador das proteínas do capsídeo viral

CD4 – Sigla de cluster of differentiation (em português: Grupamento de diferenciação 4)

CD4+ – Presença da proteína CD4 na superfície celular

CD134 – Sigla de cluster of differentiation (em português: Grupamento de diferenciação 134)

Cys – Cisteína

D' – Medida normalizada de desequilíbrio de ligação Lewontin's

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DU – Gene codificador da enzima desoxiuridina trifosfatase

ENV – Região genômica codificadora dos elementos formadores do envelope viral

FAIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina

FELV – Vírus da Leucemia Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

G - Guanina

GAG – Região genômica codificadora dos elementos formadores do capsídeo viral

Glu – Acido Glutâmico

His - Histidina

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

IN – Gene codificador da enzima integrase

LTR – Sigla de *Long Terminal repeats* (em português: regiões longas repetidas)

MA – Gene codificador das proteínas que formam a matriz

Ma – Milhões de anos

Modificações de G→A – Trocas de Guaninas para Adeninas geradas pela ação das enzimas APOBEC3

MOV10 – Fator de restrição denominado de helicase *Moloney leukemia virus 10*

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

n – Número Amostral
NC – Gene codificador das proteínas do nucleocapsídeo
NCBI – Sigla de *National Center for Biotechnology Information*
orfA – Gene acessório denominado de Fase de leitura aberta alternativa curta.
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
Pb – Pares de base
POL – Região genômica codificadora de enzimas que participam do ciclo de replicação viral
PR – Gene codificador da enzima protease
P100P – Troca sinônima de nucleotídeos que mantém o aminoácido Prolina resíduo 100
Rev – Gene regulatório denominado de Regulador de Expressão das Proteínas Virais
RNA – Ácido ribonucleico
RT – Gene codificador da enzima transcriptase reversa
SAMHD1 - Sigla de *sterile alpha motif and histidine-aspartic domain (HD) containing protein*
R68Q - Troca de um aminoácido Arginina para Glutamina no resíduo 68
SNPs – Polimorfismos de Único Nucleotídeo
SU – Proteína de superfície dos retrovírus
S65A (e S65I) – Troca de um aminoácido Serina para Alanina no resíduo 65 (ou troca de Serina para Isoleucina na posição 65)
T - Timina
TM – Proteína transmembrana dos retrovírus
TRIM5 – Fator de restrição denominado de *Tripartite motif-containing protein 5*
v. – Versão
Vif – Gene acessório denominado de Fator de Infectividade Viral
V96I – Troca de um aminoácido Valina para Isoleucina no resíduo 96
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Zn⁺² - Zinco
Z1, Z2, Z3 – Motivos de ligação de Zinco 1, 2 e 3
134698145T>C – Troca intrônica do nucleotídeo Timina para Citosina na posição genômica 134698145.
 Δ vifFIV – Virus da Imunodeficiência Felina com o Fator de Infectividade Viral deletado
 μ l - Microlitros
°C – Graus Celsius
(χ^2) – Teste Qui-quadrado de Person
< – Menor
 \leq - Menor ou Igual

1. Introdução

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) pertencem à família *Retroviridae*, gêneros *Lentivirus* e *Gammaretrovirus*, respectivamente, e possuem um impacto importante na saúde de gatos domésticos (*Felis catus*). Ambos causam quadros de imunodeficiência, são mundialmente distribuídos e se encontram entre os patógenos de felinos mais comuns. O FeLV induz sinais clínicos mais evidentes do que FIV, podendo desencadear o desenvolvimento de tumores e quadros de leucemias, linfossarcomas e síndromes mieloproliferativas, sendo que aproximadamente um terço de todas as mortes relacionadas a tumores nestes animais ocorrem devido à infecção por esse vírus. O FIV, por sua vez, gera um quadro semelhante ao que se vê na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em seres humanos, apresentando variação quanto ao seu desfecho, mas podendo alcançar um estágio crítico de imunodeficiência denominado de síndrome da imunodeficiência adquirida felina (“FAIDS”). Nesta o animal sofre de uma ampla gama de infecções oportunistas, principalmente de caráter bacteriano, podendo então ir ao óbito.

Proteínas que tem atividade contra retrovírus representam mecanismos de inibição viral bem conservados entre as espécies de mamíferos. Estas são denominadas fatores de restrição, e podem tanto ser expressas constitutivamente em alguns tipos celulares quanto induzidas por interferons. A família de genes APOBEC3 (sigla de apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3, em português apolipoproteína B de

edição de RNA 3) codifica a classe de fatores de restrição mais estudada até então. A característica comum entre essas proteínas é a presença de um ou dois motivos de ligação de Zn^{+2} que catalisam a deaminação de citidinas. Essa atividade consiste na remoção, durante o processo de transcrição reversa, do grupamento amina das citidinas, convertendo-as em uridinas, e gerando, na fita complementar, modificações de G→A. Essa alteração leva a quadros de hipermutação e à criação de *stop* códons prematuros no genoma viral, prejudicando a replicação viral.

Em felinos, é possível encontrar, no cromossomo B4, três genes *APOBEC3C* (A3Ca, A3Cb e A2Cc) e um gene *APOBEC3H*, sendo que este último da origem a um importante e conservado fator de restrição denominado de APOBEC3H. Esse gene participa ainda da codificação de outra proteína que também tem ação antiviral, a APOBEC3CH.

Pequenas regiões gênicas já se demonstraram fundamentais para manter a função, estabilidade e localização celular de proteínas homólogas à APOBEC3C em outros mamíferos e, muito embora essas proteínas tenham demonstrado papel importante na restrição viral, existem poucos estudos a respeito de sua variabilidade dentro da espécie *Felis catus*. Dessa forma, o estudo em questão visa a busca por polimorfismos nesse gene, assim como uma possível relação destes quanto à suscetibilidade à infecção por FIV e/ou FeLV. Acredita-se que os resultados desse trabalho contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos de interação entre os vírus e seu hospedeiro, o que poderá talvez, futuramente, auxiliar no controle dessas infecções.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Vírus da imunodeficiência felina (FIV)

O vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus* e é amplamente disseminado em todos os continentes (Lutz, 1990). O FIV induz efeito imunossupressor em gatos domésticos (*Felis catus*) infectados e foi descrito em 1987, por Pedersen e colaboradores, em um gatil onde os animais apresentavam sinais de imunodeficiência, porém, eram soronegativos para o vírus da leucemia felina (FeLV) (Pedersen et al., 1987).

Vírus relacionados ao FIV de gatos domésticos tem sido também isolados de uma variedade de felinos não domésticos (Carpenter & O'Brien, 1995; Olmsted et al., 1992) e o espectro de hospedeiros destes diversos vírus relacionados ao FIV ainda não é bem elucidado. Não obstante, a transmissão entre espécies já foi observada entre pumas, lincos e gatos domésticos (Troyer et al., 2005).

Estudos epidemiológicos previamente realizados mostram que a prevalência da infecção pelo FIV varia entre 2 e 30 % em diferentes países, revelando, pelo que se sugere, padrões regionais de infecção atribuídos à densidade populacional variável, status reprodutivo, idade, gênero e condições de habitação (Akhtardanesh et al., 2010; Kelly et al., 2011; Lutz et al., 2009; Norris et al., 2007). Embora o FIV tenha sido primeiramente reconhecido no Brasil em 1993 (Hagiwara et al., 1993) e na Argentina em 1994 (Tohya et al., 1994), existem poucos estudos epidemiológicos sobre a infecção na América

do Sul. Alguns dos estudos disponíveis a respeito de sua prevalência encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos sobre a prevalência de infecções por FIV na América do Sul (traduzido de Teixeira et al. (2012))

Ano	Distribuição Geográfica	Técnica	Espécie	Nº testado	% positivos
1992	Brasil/Chile	Western Blot	<i>Puma concolor</i>	18	0
1994	Argentina	Western Blot	<i>Felis catus</i>	26	34.6
1997	Brasil—São Paulo	ELISA	<i>Felis catus</i>	401	11.7
2000	Brasil—Rio Grande do Sul	PCR	<i>Felis catus</i>	40	37.5
2002	Brasil—Rio de Janeiro	ELISA	<i>Felis catus</i>	126	16.6
2003	Brasil—São Paulo	ELISA	<i>Leopardus pardalis</i> , <i>L. tigrinus</i> , <i>L. wiedii</i> , <i>Herpailurus yaguarondi</i> , <i>Oncifelis geoffroyi</i>	104	0
2003	Brasil—Minas Gerais	PCR	<i>Felis catus</i>	450	2.66
2007	Brasil—Minas Gerais	PCR	<i>Felis catus</i>	145	4.14
2006	Brasil—Roraima; Acre; Mato Grosso; Mato Grosso do Sul; São Paulo; Rio de Janeiro	ELISA/Western Blot	<i>Puma concolor</i> ; <i>Leopardus pardalis</i> ; <i>Leopardus tigrinus</i>	21	4.76/9.52
2007	Bolivia—Chaco	ELISA	<i>Leopardus pardalis</i> , <i>Oncifelis geoffroyi</i> , <i>Herpailurus yaguarondi</i>	20	0
2008	Brasil—São Paulo	PCR	<i>Felis catus</i>	454	14.7
2008	Ecuador—Galapagos	ELISA	<i>Felis catus</i>	52	0
2011	Brasil—São Paulo	ELISA/Western Blot	Diferentes espécies de felinos exóticos e neotrópicos	145	6.9 *

* Nove leões e um gato do mato

Os animais mais suscetíveis à infecção são os machos não castrados com livre acesso às ruas (Little et al., 2009). O seu comportamento agressivo na defesa de territórios, principalmente em casos de mordidas, facilita o contato com o vírus, o qual é excretado pela saliva de animais doentes (Brown et al., 1993; Little et al., 2009; Yamamoto et al., 1989). A taxa de progressão dos animais infectados por FIV é variável, com óbito ocorrendo em

aproximadamente 18 % dos animais infectados dentro dos primeiros dois anos de observação. Dentro desse período, aproximadamente 18 % desenvolvem doença severa, mas mais de 50 % permanecem assintomáticos durante os dois primeiros anos pós-infecção (Barr et al., 2000).

O curso da enfermidade causada por FIV foi dividido por Ishida e Tomoda (Ishida et al., 1989) em cinco fases distintas. Na primeira, a fase aguda, os animais podem apresentar linfadenopatia, neutropenia transitória, diarreia aguda, sintomas leves de alteração no trato respiratório superior e febre transitória. Essa fase começa semanas após a infecção e tem duração aproximada de 4 a 16 semanas. Na fase seguinte, os animais se tornam portadores assintomáticos, podendo permanecer nessa condição por um longo período de tempo. Já no terceiro estágio, o animal apresenta sinais leves da enfermidade, como, por exemplo, febre recorrente de origem desconhecida, leucopenia, linfadenopatia, anemia, anorexia, perda de peso e algumas alterações no comportamento. A quarta fase é chamada de fase do complexo associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Nesse estágio, os felinos apresentam elevada perda de peso, diarreia crônica, alterações no trato respiratório superior, estomatite, gengivite crônica, infecções crônicas da pele e linfadenopatia. As infecções que acometem os animais nessa fase geralmente são de caráter bacteriano (Gentile et al., 1996). A última fase da infecção por FIV é uma condição de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS, ou ainda "FAIDS", de síndrome da imunodeficiência adquirida felina (Goto et al, 2000)) semelhante à que ocorre nos humanos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nesse estágio, o animal desenvolve infecções

oportunistas em múltiplos órgãos e tem uma sobrevida de aproximadamente seis meses. Também podem ocorrer outros tipos de alterações imunológicas, neurológicas, oculares ou neoplásicas associadas à AIDS ou manifestações únicas da infecção por FIV (Yamamoto et al., 1989). Entretanto, mesmo que o FIV possa levar ao quadro anteriormente descrito, bastante semelhante com o que se observa na infecção pelo vírus HIV em humanos, normalmente a síndrome não é assim tão severa. Com cuidado apropriado, animais infectados por FIV podem viver durante muitos anos e, de fato, ir ao óbito por causas relacionadas à idade e não à infecção, sendo observado, até mesmo em gatos que já alcançaram o estágio da AIDS, recuperação e retorno ao estágio assintomático (Hartmann, 2012).

Assim como os lentivírus de primatas, FIV infecta linfócitos T auxiliares e monócitos/macrófagos, muito embora sua interação seja realizada com o receptor CD134 ao invés do CD4 (Shimojima et al., 2004). Semelhantemente ao vírus HIV, a anormalidade imunológica mais importante demonstrada durante a infecção é o decréscimo no número e relativa proporção de células CD4⁺ no sangue periférico, assim como nos tecidos linfáticos (Bull et al., 2003).

A organização do genoma do FIV possui muita semelhança com a organização genômica do HIV. As regiões de similaridade incluem sequências LTRs (do inglês “Long Terminal Repeats”, grandes sequências repetitivas de nucleotídeos, fundamentais para a regulação da expressão gênica); as regiões genômicas *gag*, *pol* e *env*, que codificam precursores poliproteicos, que posteriormente serão clivados em produtos funcionais pela enzima protease, e

ainda genes acessórios, auxiliares e de regulação, como *vif*, *orfA* e *rev* (Kenyon & Lever, 2011) (Figura 1).



Figura 1: Organização genômica do vírus da imunodeficiência felina (FIV). Observa-se o genoma flanqueado pelas regiões LTRs (“Long Terminal Repeats”), as três regiões genômicas distintas: *gag* (em laranja), *pol* (em azul) e *env* (em verde), e outros genes acessórios, auxiliares e de regulação como *vif* (em roxo), *orfA* (em vermelho) e *rev* (em amarelo e verde). Dentro de cada uma das três regiões genômicas citadas anteriormente encontramos genes responsáveis pela montagem e pelo ciclo de replicação viral; na figura estes estão representados pelas siglas MA (Matriz), CA (Capsídeo), NC (Nucleocapsídeo), PR (Protease), RT (Transcriptase Reversa), DU (Desoxiuridina Trifosfatase), IN (Integrase). (Modificado de Kenyon & Lever, 2011)

O precursor poliprotéico Gag é clivado nas proteínas Matriz (MA), Capsídeo (CA) (ambas proteínas estruturais) e Nucleocapsídeo (NC) (com função de ligação no genoma viral). Já o precursor Pol tem como produto funcional a Protease (PR), que cliva os precursores de proteínas importantes para a replicação viral, a Transcriptase Reversa (RT), que efetua a transcrição reversa do RNA genômico viral em DNA, a Desoxiuridina Trifosfatase (DU), com função de minimizar a incorporação errada de nucleotídeos durante a replicação viral e a Integrase (IN), cujo papel é realizar a integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro. A região *env* codifica as proteínas de superfície e as unidades transmembrana, denominadas respectivamente de SU e TM (Kenyon & Lever, 2011).

Seis subtipos de FIV já foram identificados (A, B, C, D, E e F), os quais resultam de variações genéticas na região V3-V5 do gene *env* (Duarte & Tavares, 2006; Kakinuma et al., 1995; Pecoraro et al., 1996; Sodora et al.,

1994) e no gene *gag* (Duarte & Tavares, 2006; Hohdatsu et al., 1998; Kakinuma et al., 1995; Steinrigl & Klein, 2003). No Brasil, foram encontradas apenas amostras do subtipo B, embora recentemente um estudo conduzido no Distrito Federal de Brasília tenha detectado uma amostra de FIV que, a princípio, não pode ser classificada dentro dos seis subtipos clássicos e originais (Caxito et al., 2006; Lara et al., 2007; Marçola et al., 2013).

Devido às semelhanças biológicas e patogênicas entre o FIV e o HIV, a infecção de felinos com FIV tem sido utilizada como modelo experimental no estudo do desenvolvimento da AIDS, o que faz com que investigações sobre a biologia e patogenia da FIV sejam de grande interesse à virologia.

2.2 Vírus da leucemia felina (FeLV)

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus amplamente distribuído que pertence à subfamília *Gammaretrovirus* e pode causar leucemias, linfossarcomas, síndromes mieloproliferativas e imunossupressão. Um estudo realizado por Cotter et al. (1991) mostra que, de 8642 gatos FeLV positivos recebidos em hospitais veterinários da América do Norte, 15 % apresentaram co-infecções variadas (por FIV ou pelo vírus da peritonite infecciosa - FIP, além de infecções respiratórias do trato superior, micoplasmose hemotrópica e estomatite). Além disso, 11 % apresentaram anemia, 6 % linfoma, 5 % leucopenia ou trombocitopenia e 4 % leucemia ou doenças mieloproliferativas (Cotter et al., 1991). A maior causa de mortalidade de gatos virêmicos está relacionada à imunossupressão (aproximadamente 80

%), enquanto que 20 % de letalidade são devidos ao aparecimento de tumores, principalmente linfomas (Costa et al., 2000). Assim como os animais infectados pelo FIV, os animais infectados pelo FeLV também podem agir como reservatórios de agentes de zoonoses como a toxoplasmose e a criptosporidiose (Barr et al., 2000). Antigamente se propunha que um terço de todas as mortes relacionadas a tumores em felinos eram devido a infecção por FeLV. Hoje em dia, contudo, esses dados precisam ser revisados, e a importância de FeLV como um patógeno em felinos tem diminuído (Hartmann, 2012).

Assim como o FIV, o FeLV é um vírus distribuído mundialmente e sua prevalência é variável. Estudos recentes estimam uma soro-prevalência de 2,3 % de FeLV nos Estados Unidos, de 3,4 % no Canadá, 2 % em Sidney (Austrália), 2,9 % no Japão e, em contrapartida, uma alta prevalência em Madri (Espanha) sendo de 30,4 % em gatos doentes e 15,6 % em animais saudáveis (Ariona et al., 2000; Levy et al., 2006; Little et al., 2009; Maruyama et al., 2003; Malik et al., 1997). No Brasil, há poucos estudos realizados e uma prevalência de 11,5 % foi encontrada no Rio de Janeiro (na maioria em animais doentes) e 22,5 % em fêmeas e 10 % em machos provenientes de abrigos em Belo Horizonte, Minas Gerais (de Almeida et al., 2012; Horizonte et al., 2007).

O FeLV é transmitido principalmente por contato direto entre os animais e pela ingestão de alimentos contaminados (Hoover & Mullins, 1991). Outras formas de transmissão incluem secreções respiratórias e lacrimais, leite, urina, fezes (Ariona et al., 2000), transmissão venérea e vertical (Harbour et al., 2002). Falha reprodutiva em forma de reabsorção do feto, aborto e

mortes neonatais são comuns caso a infecção por FeLV ocorra *in utero* (Cotter et al. 1998).

Em relação ao curso da enfermidade, uma nova classificação tem sido proposta com base em ferramentas imunológicas e moleculares de diagnóstico. Nesse sistema, os estágios de FeLV são definidos como infecção abortiva, infecção regressiva, infecção progressiva e infecção focal ou atípica, e algumas de suas características estão representadas na tabela 2 (Levy et al., 2008; Hofmann-Lehmann et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2008; Torres et al., 2005).

Tabela 2: Estágios da infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) (Adaptada de Hartmann et al. (2012)).

Estágios da infecção por FeLV	Antígeno p27 no sangue	Cultura viral de sangue	RNA viral no sangue	DNA viral no sangue	Cultura viral de tecido	Disseminação viral	Doença associada a FeLV
Progressiva	+	+	+	+	+	+	Provável
Regressiva	-	-	-	+	-	-	Improvável
Abortiva	-	-	-	-	-	-	Improvável
Focal	Variável	Variável	Variável	Variável	+	Variável	Improvável

A infecção abortiva é aquela em que, após a infecção, o vírus inicia uma replicação localizada no tecido linfóide da área orofaríngea. Em animais imunocompetentes, a replicação viral consegue ser controlada pela resposta imune celular e humoral, sendo assim esses animais não se tornam virêmicos. Esses animais não possuem níveis detectáveis de RNA viral ou DNA proviral no sangue e possuem altos níveis de anticorpos neutralizantes. Todavia, em muitos desses animais consegue-se encontrar resquícios de vírus tardiamente em amostras de tecidos, o que demonstra que, aparentemente, em nenhum ou

em poucos animais o vírus consegue ser totalmente eliminado (Hartmann, 2012).

A infecção regressiva se desenvolve após uma resposta imune efetiva. Nessa classificação, a replicação viral e a viremia são controladas dentro de semanas ou meses após a infecção da medula óssea (nomeada de viremia transiente), muito embora o vírus consiga espalhar-se sistemicamente através das células mononucleares (linfócitos e monócitos). Durante o período de viremia, esses animais conseguem transmitir o FeLV, principalmente através da saliva. Mesmo após controlada a infecção, os gatos que evoluem para uma infecção regressiva não são capazes de eliminar o DNA proviral do organismo, mantendo então uma “infecção latente” (na qual o DNA do vírus encontra-se integrado no genoma, mas não é transcrito ou traduzido). Durante a “infecção latente”, mesmo que o animal se apresente negativo em testes de detecção de antígeno, ele pode apresentar resultado positivo em diagnósticos moleculares. Além disso, animais latentemente infectados não transmitem o vírus para outros animais, todavia, a transcrição do DNA integrado no genoma pode ser retomada durante uma imunossupressão (Hartmann, 2012).

Em animais com infecção progressiva, a replicação do FeLV não é controlada após a infecção. Sendo assim, ocorre extensa replicação viral e viremia persistente, primeiramente em tecidos linfoides e posteriormente na medula óssea, tecidos epiteliais glandulares e de mucosa. Esses gatos tornam-se infecciosos para outros gatos durante toda sua vida, mantendo uma alta carga viral e frequentemente desenvolvendo doenças associadas à FeLV, indo

ao óbito dentro de poucos anos (Levy et al., 2008; Hofmann-Lehmann et al., 2007; Hofmann-Lehmann et al., 2008; Pepin et al., 2007; Torres et al., 2005).

Infecções focais ou infecções atípicas ocorrem em, aproximadamente, 10 % dos gatos infectados experimentalmente, sendo raras em animais naturalmente infectados. Essas condições são caracterizadas pela presença de sítios atípicos de replicação viral, como glândulas mamárias, bexiga e olhos. Como essa replicação pode levar a uma pequena ou intermitente produção de antígenos, os testes sorológicos de detecção costumam gerar resultados fracamente confiáveis ou discordantes (Levy et al., 2008).

Assim como o retrovírus HIV-1, esse vírus apresenta uma ampla variação genética devido à falta de uma atividade de revisão da transcriptase reversa (RT) e à recombinação com outras sequências endógenas de FeLV (Overbaugh & Bangham, 2001). A organização genômica desse vírus, novamente, é semelhante à do FIV, no entanto, diferentemente desses retrovírus, não é verificada a presença do gene *vif* (Münk et al., 2010) (Figura 2).

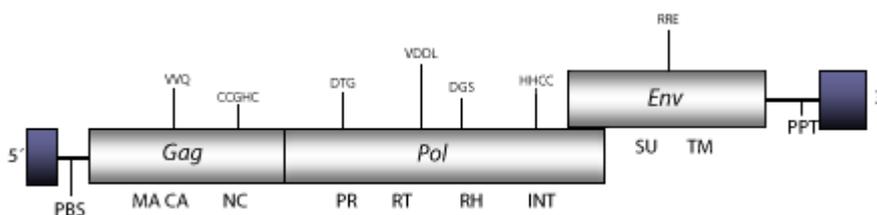


Figura 2: Organização genômica do vírus da leucemia felina (FeLV). As regiões LTR encontram-se em azul e os motivos de aminoácidos ressaltados com as linhas indicam os resíduos conservados em cada domínio proteico. MA= matriz; CA= capsídeo; NC = nucleocapsídeo; PPT = trato de polipurina; PR = protease; RT = transcriptase reversa; RH = RNaseH; PBS = sítio de ligação de *primer*; INT = integrase; SU = proteína de superfície; TM = unidade transmembrana (Fonte: <http://gydb.org/index.php/Element:FeLV>).

Suas regiões LTR, como nos demais gamaretrovírus, são as principais responsáveis por seu potencial oncogênico (Chandhasin et al., 2004). O FeLV ocorre na natureza não apenas como uma única espécie genômica, mas como uma família de vírus relacionados, derivados de recombinações e erros da RT durante a replicação viral. Quatro subgrupos desse retrovírus já foram identificados e designados como FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T. Esses vírus diferem geneticamente entre si devido a diferenças encontradas na sequência da região SU. Eles também diferem, funcionalmente, por sua interação com diferentes receptores do hospedeiro no momento de sua entrada na célula (Flores, 2012).

O FeLV-A é o principal patógeno transmitido horizontalmente, está presente em todos os gatos FeLV positivos e desencadeia nos animais uma imunossupressão grave. Acredita-se que os outros três subgrupos tenham se originado *de novo* a partir do FeLV-A, através de mutações pontuais, inserções e/ou recombinações com sequências endógenas FeLV-relacionadas durante a replicação viral (Flores, 2012). O FeLV-B acomete cerca de 50 % dos felinos FeLV positivos e aumenta a frequência de doenças neoplásicas quando comparados animais FeLV A e B positivos com animais somente FeLV-A positivos. Por sua vez, o FeLV-C ocorre apenas em cerca de 1 % dos gatos positivos e origina um quadro de anemia grave e não-regenerativa (Lyer et al., 2005). O FeLV-T encontra-se relacionado a quadros de imunodeficiência (Donahue et al., 1991).

2.3 Fatores de restrição

Em adição às respostas inata e adaptativa do sistema imune, humanos e outros mamíferos também desenvolveram fatores antivirais específicos de natureza proteica. Essas proteínas, denominadas de fatores de restrição, são mecanismos de inibição bem conservados e são expressas constitutivamente em alguns tipos celulares e/ou induzidas por interferons. (Berthoux et al., 2005; Kirchhoff et al., 2012; Virgen & Hatzioannou, 2007).

Em geral, fatores de restrição são identificados em células que se apresentam não permissivas à infecção viral, ou seja, onde a replicação do vírus é severamente suprimida. Essa restrição é dominante, de modo que, quando uma célula não permissiva é fusionada com uma permissiva, o resultado é um heterocário com fenótipo restritivo (Zheng et al., 2012).

As três maiores e mais conhecidas classes de fatores de restrição são as enzimas apolipoproteínas B de edição de RNA (APOBEC3 ou A3) (Jarmuz et al., 2002), TRIM5 α (Stremlau et al., 2004) e Teterina (Neil et al., 2008), além de fatores identificados mais recentemente, como MOV10 (Wang et al., 2010) e SAMHD1 (Berger et al., 2011; Laguette et al., 2011). Um resumo de como essas proteínas podem agir durante a restrição da replicação viral pode ser observado na figura 3.

Descobertas a respeito desses fatores não apenas fornecem um conhecimento mais extenso do ciclo de replicação viral e da interação com a célula hospedeira, mas também oferecem possíveis alvos de intervenção no desenvolvimento de drogas anti-virais (Zheng et al., 2012).

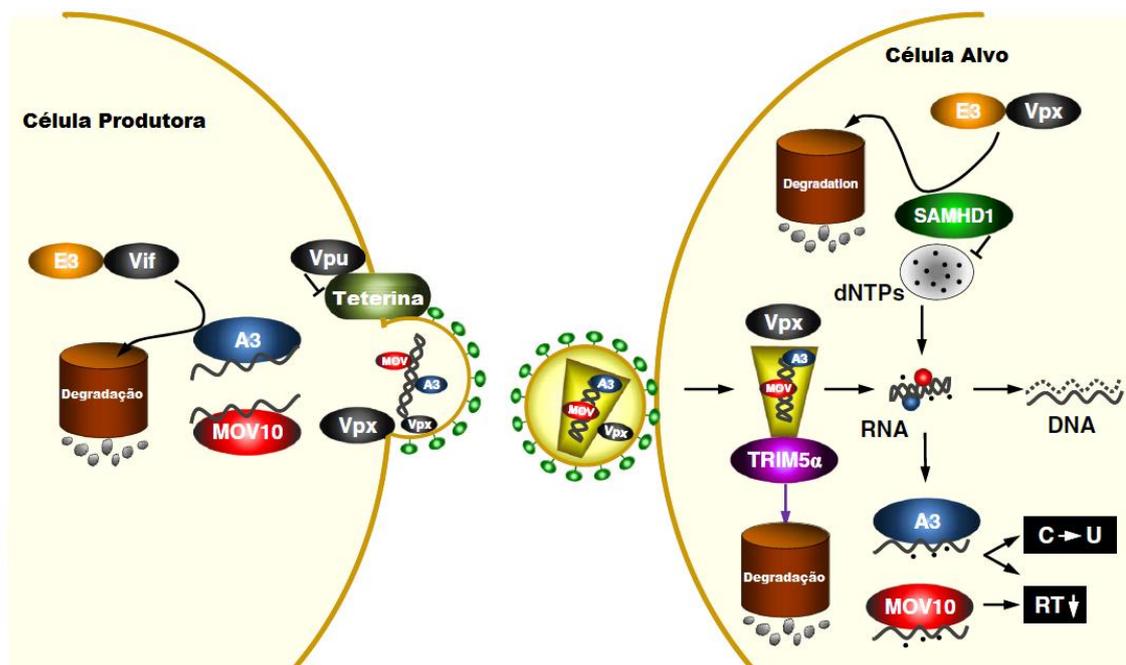


Figura 3: Ilustração esquemática da ação dos fatores de restrição durante a replicação dos lentivirus de primatas. Em células produtoras de virions, tanto proteínas A3 quanto MOV10 são empacotadas nos vírions, via interação com Gag e RNA viral. A transcrição reversa pode ser diretamente inibida por MOV10 e proteínas A3 ou indiretamente por SAMHD1, após a depleção intracelular do pool de Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP). Em adição a esses mecanismos, as proteínas A3 ainda catalisam a deaminação de citidinas (C-para-U) na fita de cDNA sintetizada. Além disso, o brotamento e a liberação viral podem ser inibidos pela proteína de superfície celular Teterina, mecanismo que é neutralizado pela proteína viral Vpu. A proteína celular TRIM5 α , por sua vez, interage com as proteínas Gag recém produzidas e desencadeia um desnudamento prematuro do capsídeo viral. Por outro lado, lentivírus se “defendem” da ação desses fatores de restrição de várias formas. Proteínas A3, por exemplo, podem ser marcadas para degradação proteossômica por ação da proteína viral Vif. A proteína viral Vpx (presente em HIV-2 e em algumas linhagens de SIV) é também empacotada dentro do virion via interação direta com Gag e pode levar à degradação proteossômica de SAMHD1. Adaptada de Zheng et al. (2012).

2.4 Genes e proteínas APOBEC3

Os genes da família *APOBEC3* ou A3 codificam a classe de fatores de restrição mais estudada até então e que pertence à superfamília de citidinas deaminases (Wedekind et al., 2003). Esta superfamília inclui mais quatro

membros: Deaminase induzida por ativação (*AID*), *APOBEC1*, *APOBEC2* e *APOBEC4* (Jarmuz et al., 2002; Rogozin et al., 2005). Os genes dessa família podem ser classificados de acordo com a quantidade de motivos de ligação de Zinco (Zn^{+2}), denominados de domínios Z, os quais compreendem a sequência His-Xaa-Glu-Xaa-23-28-Pro-Cys-Xaa2-4-Cys. Nesta, Xaa pode ser quase qualquer aminoácido, a histidina (His) e os dois resíduos de cisteína (Cys) ligam o íon Zn^{+2} e o ácido glutâmico (Glu) está envolvido na translocação de prótons (Jarmuz et al., 2002).

Existem três tipos de domínios Z presentes nessas proteínas, nomeados de Z1, Z2 e Z3 e distribuídos em diferentes espécies de mamíferos. Esses motivos correspondem a três subgrupos filogenéticos que possuem histórias evolutivas diferentes e que se originaram de eventos como duplicação e fusão de genes (inclusive entre os subgrupos), gerando o que se encontra hoje em questão de quantidade e diversidade dentro do *locus* A3 nas diferentes espécies de mamíferos. Estudos indicam que o ancestral comum mais recente entre a família A3 e seu grupo irmão AID data de 420 milhões de anos (Ma) (Münk et al., 2012). Subsequentemente, devido a dois eventos de duplicação, o gene A3 ancestral gerou três genes diferenciados, cada um dando origem a um dos três domínios Z, gerando então os três subgrupos. Esses eventos não puderam ser datados com precisão, mas acredita-se que o primeiro ocorreu há cerca de 247 Ma e o segundo há aproximadamente 199 Ma atrás (Münk et al., 2012).

O *locus* A3 é flanqueado pelos genes *CBX6* e *CBX7* de maneira conservada. Todavia, nesse *locus*, existe muita variação interespecífica quanto ao número e ao arranjo dos genes, especificidade de substrato, presença de genes fusionados, padrões de expressão gênica, *splicing* alternativo e mecanismos de *read-through*. A fixação dos genes A3 duplicados ou modificados é dirigida por uma forte pressão seletiva, e qualquer aquisição de diferenças entre os genes é responsável por alterar suas chances de preservação naquela linhagem assim como pode alterar sua função, ou resultar em sua perda (Ohno, 1970). Acredita-se que tantas variações dentro do *locus* reflitam o resultado de um balanço entre uma possível toxicidade das proteínas A3 em relação ao DNA celular e a necessidade de combater a emergência de patógenos virais (Münk et al., 2012).

Em humanos, a família passou a incluir sete genes que foram nomeados de *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3DE*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G* e *APOBEC3H* (*A3A* até *A3H*) (Jarmuz et al., 2002). Já em mamíferos não-primatas é proposta também uma nomenclatura alternativa baseada nos domínios Z (La Rue et al., 2008; La Rue et al., 2009). Os roedores possuem apenas um gene *APOBEC3* (*A3Z2-Z3*), e os felinos, três genes semelhantes à *APOBEC3C* (*A3Ca* até *A2Cc*, nomeados alternativamente como *A3Z2a*, *A3Z2b*, *A3Z2c*), provenientes de eventos de duplicação, e um gene semelhante à *APOBEC3H* (*A3Z3*) (Münk et al., 2008) (Figura 4).

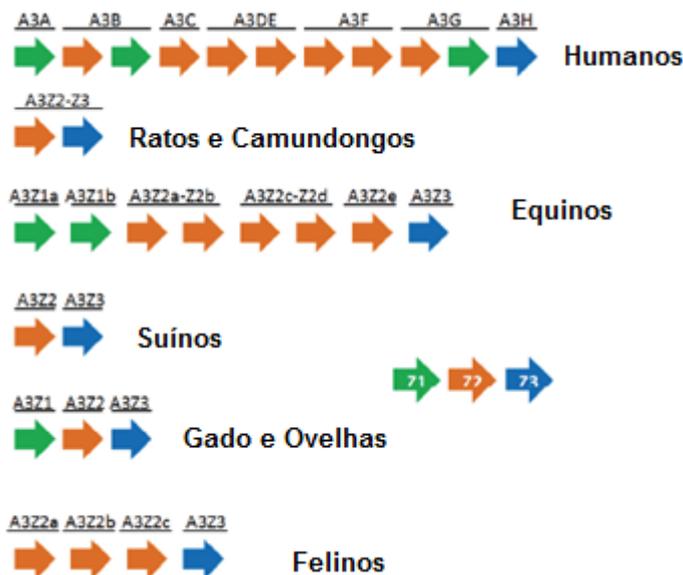


Figura 4: Ilustração esquemática dos genes A3 nos mamíferos indicados. Domínios Z1, Z2 e Z3 são demonstrados em verde, laranja e azul, respectivamente. Adaptado de Jónsson & Andrésdóttir (2013).

A expressão das proteínas A3 nas células infectadas acaba gerando sua encapsidação na progênie viral, provavelmente através da interação com proteínas Gag e RNA viral. Conseqüentemente, essas proteínas celulares serão entregues à próxima célula infectada, onde realizarão sua atividade de restrição (Cen et al., 2004; Luo et al., 2004; Schäfer et al., 2004). A seguir, os domínios Z dessas proteínas catalisam sua atividade de deaminação, que consiste em remover o grupamento amina das citidinas na posição C4, as convertendo em uridinas, e gerando, na fita complementar, modificações de G→A. Essa alteração leva a hipermutações e à criação de códons de terminação prematuros no genoma viral (Wedekind et al., 2003), os quais constituem uma das principais bases da atividade de restrição de retrovírus como HIV-1, FIV e FeLV (Bishop et al., 2004; Dang et al., 2006; Sakai et al., 2006; Schrofelbauer et al., 2004). Além disso, outros mecanismos de restrição

também são propostos para as proteínas A3, como a interferência no processo de transcrição reversa (Adolph et al., 2013).

Foi observado em humanos e felinos infectados por HIV-1 ou FIV, respectivamente, que a atividade das citidinas deaminases é, em sua maioria, contra-atacada por uma proteína conservada entre os lentivírus e denominada de Fator de Infectividade Viral (Vif). Esta proteína gera poliubiquitinação das APOBEC3 e induz à posterior degradação proteossômica dessas proteínas (Bishop et al., 2004; Münk et al., 2008; Sakai et al., 2006, Schrofelbauer et al., 2004). Além disso, descobriu-se que a proteína Vif do vírus HIV-1 também pode inibir a tradução da proteína A3G em humanos através de uma forte ligação com seu respectivo mRNA (Mercenne et al., 2010). Até o momento não há trabalhos publicados descrevendo esse último mecanismo para a Vif em retrovírus de felinos.

2.5 Gene APOBEC3H

O gene *A3H* é o membro mais distantemente relacionado da família APOBEC3 (Conticello et al., 2005) e as proteínas A3H de humanos e felinos apresentam identidade de 51% (Larue et al., 2010). Nessas duas espécies, o gene está presente, respectivamente, nos cromossomos 22 e B4 (Jarmuz et al., 2002; Münk et al., 2008).

Foi demonstrado que o gene *A3H* de humanos apresenta-se em quatro haplótipos mais frequentes, nomeados de I a IV. As proteínas codificadas pelo gene *A3H* de humanos, com exceção da proteína gerada pelo haplótipo II, não possuem uma atividade antiviral efetiva. Isso contrasta com o que ocorre em *Macacus rhesus*, cujas proteínas A3H funcionam como

eficientes inibidores retrovirais (Dang et al., 2008; Kinomoto et al., 2007; Li & Emerman, 2011; OhAinle et al., 2006). Essa variabilidade na atividade antiviral durante a evolução dos primatas provavelmente se deve à perda da estabilidade da proteína A3H humana, a qual apresenta, em geral, uma meia-vida mais curta do que a proteína homóloga de outros primatas (Li & Emerman, 2011).

Em felinos, o gene *A3H* compreende um fragmento de 2237 pb, contém um éxon não traduzido 5' seguido de quatro éxons codificantes e sofre *splicing* alternativo (Münk et al., 2008). A proteína A3H de felinos é uma proteína estável que possui atividade inibitória comprovada contra vírus FIV deficiente de *vif* (Δvif FIV). Experimentalmente, quando a proteína foi expressa após a transfecção de um plasmídeo em células infectadas com FIV, houve uma redução de cinco vezes na infectividade do vírus. Essa atividade está relacionada com um aumento significativo na taxa de substituições de G→A (1,61%) comparada com genomas virais derivados de células não transfectadas. No mesmo estudo, demonstrou-se que o fator de restrição em questão também apresenta atividade, embora menos pronunciada, contra a infecção pelo vírus FeLV (Münk et al., 2008).

Além do transcrito correspondente à proteína A3H, o gene em questão também participa da formação de outro transcrito através de *read-through* e *splicing* alternativo, denominado de A3CH. Esse mRNA é composto pelos éxons 1-3 de A3Ca, a sequência codificante do éxon 4 de A3Cb e os éxons 2-5 da A3H (figura 5). A proteína gerada a partir desse transcrito possui também uma pronunciada atividade anti-retroviral, igualmente através da

geração de hipermutações (Münk et al., 2008), apresenta papel restritivo com relação a retrovírus de felinos, especialmente ao FIV.

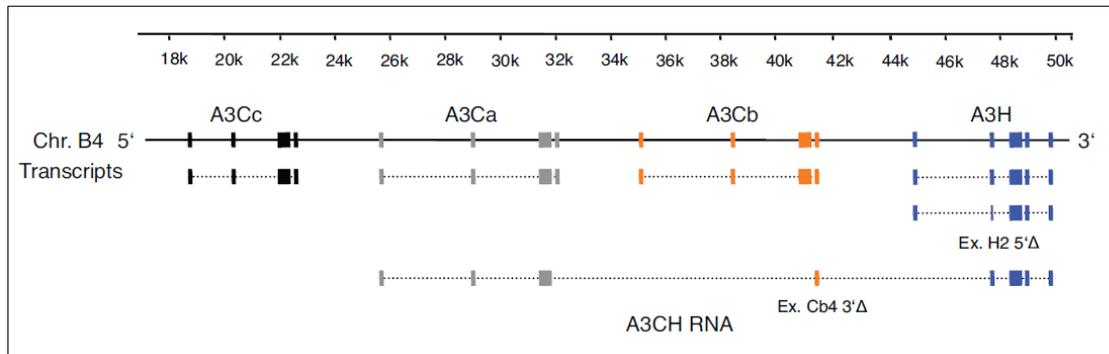


Figura 5: Representação da região genômica *APOBEC3* em felinos e seus respectivos transcritos. (Adaptado de Münk et al., 2008).

Entretanto, existem poucos estudos que determinem a relação entre a variabilidade na sequência desse gene com a sensibilidade à infecção por retrovírus e a indução de hipermutações no genoma de retrovírus felinos.

3. Justificativa

Considerando a importância e magnitude da atividade anti-retroviral exercida pelo fator de restrição A3H em gatos, torna-se relevante a busca por polimorfismos nessa proteína. Foi demonstrado que pequenas alterações influenciam a estabilidade e localização celular de proteínas homólogas a ela em outros mamíferos, como humanos e outros primatas. No entanto, o número reduzido de sequências dos genes *APOBEC3H* de felinos já analisadas e depositadas em bancos de dados, assim como a falta de estudos a respeito desse assunto, justificam a importância dessa procura, especialmente em animais infectados por retrovírus felinos.

Além disso, uma melhor compreensão dos mecanismos de interação entre o FIV e FeLV e seus hospedeiros poderá contribuir, não apenas para o conhecimento a respeito da evolução desse fator de restrição dentro dos grupos de mamíferos selecionados, como também para compreender melhor a relação entre os retrovírus de felinos e seus hospedeiros e auxiliar no controle dessas infecções.

4. Objetivos

Objetivo Geral

- Identificar polimorfismos e haplótipos presentes no gene *A3H* de gatos domésticos (*Felis catus*) infectados ou não por FIV e/ou FeLV e relacionar essas variações com a susceptibilidade à infecção por esses vírus.

Objetivos específicos

- Buscar polimorfismos no gene *APOBEC3H* de felinos infectados e não infectados pelos vírus FIV e FeLV
- Correlacionar a presença de polimorfismos (e haplótipos) com a sensibilidade a infecção por retrovírus em felinos

5. Materiais e métodos

5.1 Amostras de sangue de felinos

Foram utilizadas amostras de DNA provenientes de sangue periférico total de gatos domésticos (*Felis catus*) FIV e/ou FeLV positivos e negativos que se encontravam disponíveis no laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com sede no Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Essas amostras foram obtidas de gatos machos e fêmeas domésticos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. Após a coleta, o sangue dos animais foi mantido em tubos mantidos refrigerados durante o transporte até ao laboratório, onde o DNA foi extraído utilizando fenol equilibrado e seguida diagnosticadas para FIV e FeLV através do método de PCR com oligonucleotídeos iniciadores visando a região do gene *Gag* (Finoketti, *in prep*). Uma alíquota foi retirada para o teste e o restante foi congelado a -70°C .

Foi obtido um total de 59 amostras de animais controle não infectados, e 50 amostras positivas para retrovírus felinos, sendo destas 18 positivas apenas para FIV, 15 positivas apenas para FeLV e 17 positivas para os dois vírus.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS.

5.2 Determinação de polimorfismos no gene *A3H* de felinos

As amostras de DNA celular dos 109 gatos foram submetidas à amplificação do gene *A3H* através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando os softwares Oligo Explorer 1.5 e Oligo Analyzer 1.5, com base na sequência depositada no Genbank sob código de acesso EU109281, tendo como objetivo amplificar duas regiões distintas do gene *A3H* de felinos (Tabela 3). Tais regiões foram assim escolhidas com base no conhecimento sobre o efeito anti-retroviral exercido por deleções e SNPs em porções homólogas a essas no gene *A3H* de humanos (Li & Emerman, 2011).

Tabela 3: Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das duas diferentes regiões do gene *A3H* e respectivos tamanhos dos produtos.

Regiões genômicas	Oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon
1	Senso = 5' - ACACCAGAAGACACTCTCTGC - 3' Antisense = 5' - CCTCTTGGCTTCTCAGAAACG - 3'	401 bp
2	Senso = 5' -TCATCCCAATGGCACCCACAGC-3' Antisense = 5' -TCAAACCTCTGAGACGGAGGAGGAG-3'	589bp

A primeira região compreendeu o primeiro éxon codificante do gene e o íntron adjacente (posições 1-401, segundo a sequência referência GenBank: EU109281.1) e a segunda compreendeu o segundo éxon codificante e porções dos íntrons que o flanqueiam (entre as posições 707-1296, segundo GenBank: EU109281.1) (figura 6).

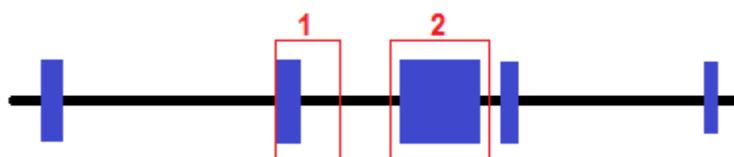


Figura 6: Esquema representativo do gene *APOBEC3H* de felinos indicando, em vermelho, as regiões amplificadas nesse estudo.

Os volumes e as concentrações que foram usados nas reações de PCR, num total de 25 µl, e encontram-se especificados na tabela 4. Tanto para a amplificação da primeira quanto da segunda região, as condições padronizadas iniciam-se em um primeiro ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C (desnaturação), 55°C (anelamento) e 72°C (extensão) durante 30 segundos, e, por fim, um ciclo de extensão final de 3 minutos a 72°C.

Tabela 4: Volumes e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de amplificação das duas regiões do gene *A3H* de felinos.

Região 1	Região 2
2,5 µl Buffer 1X	2,5 µl Buffer 1X
1,0 µl dNTP (0,8mM)	1,25 µl Dimetilsulfóxido (DMSO) (5%)
0,5 µl MgCl ₂ (1,5mM)	1,0 µl dNTP (0,8mM)
0,5 µl <i>Primer F</i> (5pM)	0,5 µl MgCl ₂ (1,5mM)
0,5 µl <i>Primer R</i> (5pM)	0,5 µl <i>Primer F</i> (5pM)
0,3 µl Taq (1,25U)	0,5 µl <i>Primer R</i> (5pM)
18,7 H ₂ O MiliQ	0,3 µl Taq (1,25U)
1ul de DNA (100ng)	17,45 H ₂ O MiliQ
	1ul de DNA (100ng)

Após a amplificação, foi realizada a migração e análise desses produtos em gel de agarose a 1%.

Para realizar a análise da variabilidade nas sequências obtidas, todos os amplicons, de ambas as regiões, foram enviados para sequenciamento em ambas as orientações no laboratório ACTGene Análises Moleculares LTDA. O sequenciamento foi feito com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing e o equipamento ABI 3100 Genetic Analyzer.

As sequências obtidas (assim como seus respectivos eletroferogramas) foram então analisadas, editadas e alinhadas nos programas BioEdit, SeqMan e EditSeq (DNASTar software). As frequências genotípica e alélica foram determinadas através do método de contagem direta e, posteriormente, foi realizado, utilizando-se esses dados, o cálculo do equilíbrio Hardy-Weinberg.

5.3 Análise dos genótipos dos haplótipos encontrados na população de estudo

Após a obtenção e análise da qualidade das sequências, essas foram submetidas à avaliação com *softwares* de bioinformática para análise dos haplótipos existentes nas amostras analisadas. Esses processos foram feitos separadamente entre animais positivos e negativos.

Para determinar os haplótipos encontrados, assim como inferir a sua probabilidade estatística de corresponderem a combinações reais, as sequências, após edição, foram submetidas ao programa MLOCUS. Através da obtenção desses dados, a frequência de cada haplótipo encontrado foi contabilizada com a utilização do software DnaSP, sendo possível então observar quais deles eram mais ou menos presentes em cada um dos grupos dentro da população de estudo.

Assim como a determinação dos haplótipos presentes, o equilíbrio de ligação também foi calculado para os *loci* em questão, considerando em desequilíbrio *loci* que apresentassem valores de Desequilíbrio de ligação normalizado (D' de Lewontin's) maiores que 0,33.

5.4. Análise estatística

A fim de verificar se existe correlação entre as frequências encontradas dos polimorfismos e dos haplótipos e a susceptibilidade à infecção por retrovírus de felinos, foram realizados os testes qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste exato de Fischer (quando $n < 5$) entre os grupos de animais positivos e negativos (para ambos os vírus e também separadamente para cada um deles).

Todas as análises acima citadas foram realizadas no software SPSS v.17. Para os testes que forneceram resultados significativos ($p < 0,05$) foi realizada a análise de resíduos de ajustados com a utilização do programa WinPepi v. 11.32.

6. Resultados

6.1 Determinação dos polimorfismos no gene *A3H* felino

As duas regiões do gene *A3H* foram amplificadas com sucesso em reação de PCR, obtendo-se fragmentos do tamanho esperado em todas as amostras (n total =109, 59 amostras de gatos FIV e/ou FeLV positivos e 50 amostras de gatos negativos). As respectivas sequências apresentaram uma boa qualidade e tiveram suas identidades confirmadas através do uso da ferramenta BLAST (Figura 7). Através da análise dos sequenciamentos pelos softwares de bioinformática anteriormente citados, verificou-se que as regiões possuem diferentes níveis de variação quanto à existência de polimorfismos nas sequências de nucleotídeos.

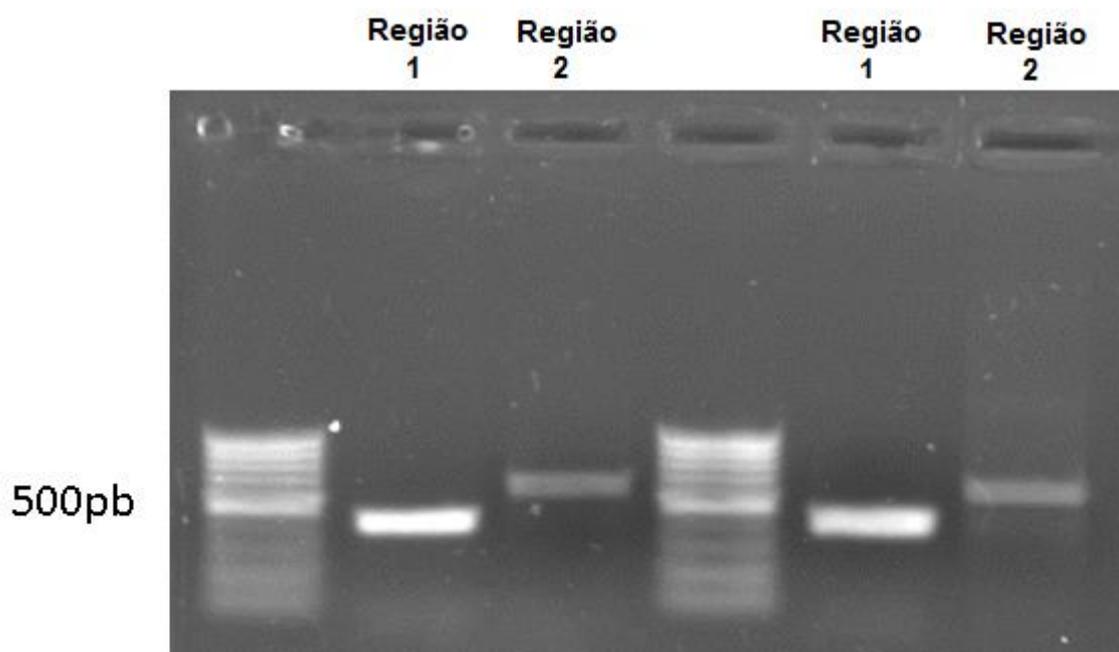


Figura 7: Amplificação das duas regiões de interesse do gene *A3H* de felinos.

Dentro da região 1, foi possível analisar com precisão um total de 313 pb, correspondentes aos primeiros pares de base codificantes do gene. As sequências obtidas apresentaram-se extremamente conservadas entre todas as amostras analisadas, independentemente se pertenciam a animais infectados (por um ou ambos os retrovírus), ou se provinham de animais negativos. Um alinhamento múltiplo parcial dessas sequências, realizado indiscriminadamente com sequências positivas ou negativas e efetuado no software Clustal W (Bioedit), é apresentado na figura 8. Pode-se observar também que essa região não se apresentou idêntica apenas entre a totalidade das amostras testadas, mas também teve 100% de identidade com a sequência referência do Genbank (número de acesso EU109281), apresentada na primeira linha do alinhamento.



Figura 8: Alinhamento parcial de 313 nucleotídeos amplificados da região 1 do gene *A3H* de diferentes amostras.

Quanto ao sequenciamento da segunda região, foi possível analisar uma totalidade de 450 pb das 109 amostras, e esta, em contraste com a primeira região, apresentou variação entre as amostras analisadas. Foram identificados, ao todo, seis polimorfismos (com frequência maior do que 1 %), sendo cinco existentes dentro do éxon e um intrônico (figura 9). Dentre os cinco primeiros, quatro deles são polimorfismos não-sinônimos, configurando troca de aminoácidos na sequência da proteína, e um deles é um polimorfismo sinônimo. Os seis polimorfismos em questão foram nomeados respectivamente como A65S (e A65I), R68Q, A94T, V96I, P100P e 134698145T>C.

A primeira variação citada, na posição 65 (A65S e A65I), configura uma tripla possibilidade de troca no *locus* em questão, que pode apresentar

tanto uma Guanina (G) quanto uma Timina (T) ou uma Adenina (A). Na sequência referência, o nucleotídeo presente é um G, o que determina a codificação do aminoácido Alanina naquela posição. Quando existe a troca para o nucleotídeo T, ocorre à substituição para Serina. Já a troca para o nucleotídeo A sempre vem acompanhada de um T na posição 884 e essa combinação gera o aminoácido Isoleucina. Os dois polimorfismos seguintes, R68Q e A94T, configuram trocas de uma Arginina para uma Glutamina na posição 68 e de uma Alanina para uma Treonina na posição 94, respectivamente, e apareceram sempre juntos em todas as amostras onde estavam presentes. Da mesma forma, V96I e P100P são encontrados concomitantemente nas sequências analisadas, sendo que a primeira troca configura troca de uma Valina por uma Isoleucina na posição 96 e a segunda se trata de uma troca de nucleotídeos sem que haja mudança de aminoácidos, permanecendo a Prolina na sequência da proteína. A mutação 134698145T>C, por sua vez, é intrônica e considera uma transversão de Timina por uma Citosina na posição cromossômica 134698145.



Figura 9: Alinhamento parcial de algumas sequencias obtidas da região 2 do gene *A3H* de felinos representando os seis polimorfismos encontrados (indicados por números em vermelho 1-6, sendo 1: A65S (A65I), 2: R68Q, 3:A94T, 4:V96I, 5:P100P e 6:13469145T>C). Alinhamento feito no software SeqMan.

A frequência de cada um dos genótipos encontrados na população apresentam-se expostas na tabela 5. Para alguns polimorfismos (V96I e P110P), apenas dois genótipos foram observados, não sendo verificada a existência do homozigoto mutante.

As frequências de cada polimorfismos encontravam-se em equilíbrio Hardy-Weinberg.

Tabela 5: Quantidades e frequências dos genótipos detectados em cada um dos polimorfismos dentro da população de animais estudada.

Polimorfismo	Códons	Genótipo	Animais FIV e/ou FeLV positivos (n=50)	Animais negativos (n=59)
A65S (A65I)	TCA/TCA	TT	13 (26%)	5 (8,5%)
	TCA/GCA	TG	21 (42%)	27 (45,7%)
	TCA/ATA	TA	0 (0%)	5 (8,5%)
	GCA/GCA	GG	14 (28%)	21 (35,6%)
	GCA/ATA	GA	2 (4%)	1 (1,7%)
R68Q	CAG/CAG	AA	2 (4%)	2 (3,45%)
	CAG/CGG	AG	5 (10%)	8 (13,5%)
	CGG/CGG	GG	43 (86%)	49 (83%)
A94T	ACG/ACG	AA	2 (4%)	2 (3,45%)
	ACG/GCG	AG	5 (10%)	8 (13,5%)
	GCG/GCG	GG	43 (86%)	49 (83%)
V96I	ATC/GTC	AG	7 (14%)	4 (6,8%)
	GTC/GTC	GG	43 (86%)	55 (93,2%)
P100P	CCC/CCT	CT	7 (14%)	4 (6,8%)
	CCC/CCC	CC	43 (86%)	55 (93,2%)
134698145T>C		TT	18 (36%)	18 (30,5%)
	-	CT	14 (28%)	25 (42,4%)
		CC	18 (36%)	16 (27,1%)

6.2 Análise da correlação dos alelos e dos genótipos com a susceptibilidade à infecção por retrovírus

A fim de verificar se a existência de algum dos polimorfismos separadamente confere susceptibilidade à infecção por FIV e/ou FeLV, foram aplicados o teste qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste exato de Fischer

(quando $n < 5$) levando em consideração a presença ou ausência de infecção viral, os diferentes genótipos e também a simples presença dos alelos nas sequências obtidas.

Após a análise dos seis polimorfismos e seus respectivos genótipos, foi encontrada uma correlação positiva entre o polimorfismo na posição 65 (A65S ou A65I) e a presença de infecção viral ($p \leq 0,05$). Foi observado, após a análise de resíduos, que, a presença do genótipo “TT” foi correlacionada positivamente com a maior susceptibilidade à infecção pelos retrovírus felinos em questão. Esse resultado foi observado tanto quando às amostras de animais positivos eram analisadas juntas (unindo animais infectados por FIV e/ou FeLV em um mesmo grupo de análise) quanto separadamente (dividindo em dois grupos entre os gatos infectados por FIV ou por FeLV). O genótipo “TA” desse mesmo polimorfismo também foi correlacionado positiva e significativamente com a presença de infecção viral, todavia, apenas quando animais positivos para FIV e/ou FeLV eram analisados como um único grupo, e não quando animais FIV ou FeLV positivos eram analisados em separado. Os valores estatísticos para cada um dos genótipos desse polimorfismo após a análise de resíduos ajustados encontram-se expressos nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6: Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FIV e/ou FeLV positivos e negativos.

Polimorfismo	Genótipo	Animais FIV e/ou FeLV positivos (n=50)	Animais controle (n=59)	Valor de P (resíduos ajustados)
A65S (A65I)	TT	13	5	0.014*
	TG	21	27	0.693
	TA	0	5	0.035*
	GG	14	21	0.398
	GA	2	1	0.464

Tabela 7: Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FIV positivos e negativos.

Polimorfismo	Genótipo	Animais FIV positivos (n=35)	Animais FIV negativos (n=74)	Valor de P (resíduos ajustados)
A65S (A65I)	TT	10	8	0.020*
	TG	14	34	0.559
	TA	0	5	0.115
	GG	9	26	0.325
	GA	2	1	0.194

Tabela 8: Análise dos resíduos ajustados do polimorfismo S65A (S65I) entre animais FeLV positivos e negativos.

Polimorfismo	Genótipo	Animais FeLV positivos (n=32)	Animais FeLV negativos (n=78)	Valor de P (resíduos ajustados)
A65S (A65I)	TT	11	7	0.001*
	TG	11	37	0.257
	TA	0	5	0.149
	GG	9	26	0.664
	GA	0	3	0.268

Nenhum dos outros polimorfismos encontrados demonstrou ter correlação positiva com a presença ou ausência de infecção viral nas amostras testadas.

6.3 Análise dos haplótipos encontrados na população correlacionando com a susceptibilidade à infecção por retrovírus

Realizou-se, através do software de bioinformática MLocus, a análise dos haplótipos, ou seja, das combinações existentes entre os seis polimorfismos encontrados, que se encontravam presentes nas sequências referentes à região 2. Um total de dez haplótipos foi observado dentre as 109 amostras, e sua presença foi verificada e contabilizada em ambos os cromossomos dos animais, totalizando 218 haplótipos analisados, sendo o haplótipo “GGGGCT” o predominante, encontrado 101 vezes. As combinações presentes na população assim como sua frequência total na população e também discernida entre animais positivos para FIV e/ou FeLV ou negativos encontram-se apresentadas na tabela 9. O equilíbrio de ligação calculado entre os polimorfismos indicou que todos os *loci* estão segregando juntos (valores de $D' < 0,33$).

Tabela 9: Os dez haplótipos encontrados na população de estudo e suas respectivas frequências dentro dos grupos.

Haplótipo	Diagnóstico		N Total	Frequência
	FIV/FELV+	FIV/FELV-		
	Freq	Freq		
AGGGCC	1 0,01	6 0,051	7	0,03211009
TGGGCT	3 0,03	2 0,017	5	0,02293578
AGGGCT	1 0,01	0 0	1	0,00458716
GGGATC	2 0,02	0 0	2	0,00917431
GGGGCC	4 0,04	15 0,127	19	0,08715596
TGGATC	5 0,05	4 0,034	9	0,0412844
GGGGCT	46 0,46	55 0,466	101	0,46330275
TGGGCC	29 0,29	24 0,203	53	0,24311927
TAAGCC	8 0,08	12 0,102	20	0,09174312
TAGGCC	1 0,01	0 0	1	0,00458716
Total	100	118	218	1

Da mesma forma que foi avaliada a correlação entre os alelos e genótipos e a presença ou ausência de infecção viral, o teste de qui-quadrado foi aplicado para cada um dos haplótipos encontrados buscando determinar a mesma correlação. Foi observada uma associação entre a presença do haplótipo “GGGGCC” e a não existência da infecção viral, sendo essa combinação encontrada em uma frequência maior dentro dos animais do grupo negativo ($p=0,023$).

7. Discussão

Segundo dados existentes na literatura, existem fortes indícios que o gene *A3H* de gatos domésticos possui importante papel na restrição de retrovírus felinos, participando da codificação de, não apenas uma, mas duas proteínas com ação antiviral comprovada, denominadas de A3H e A3CH (Münk et al., 2008). Além disso, sabe-se também que esse gene está presente em diversas outras espécies de mamíferos e se encontra conservado durante a evolução do *locus* da família APOBEC3 (Münk et al., 2012), o que embasa ainda mais os dados a respeito de sua importância como fator de restrição.

É de conhecimento que, em humanos, a sequência do gene *A3H* apresenta variabilidade, e há diferentes haplótipos relacionados a potenciais de restrição viral diferentes (Harari et al., 2009). Como apenas poucas sequências referentes ao gene *A3H* de felinos domésticos encontram-se disponíveis na literatura, e, da mesma forma, poucas foram analisadas quanto à diversidade (Münk et al., 2008), esse estudo foi desenhado para acessar a variabilidade desse gene em exemplares de gatos domésticos infectados ou não com retrovírus felinos, visando um melhor conhecimento sobre a relação entre a proteína A3H e esses vírus. Para isso foram analisadas, a partir de amostras de DNA extraído de 109 animais, duas regiões gênicas importantes, ambas contendo segmentos que participam da codificação das duas proteínas antivirais anteriormente citadas.

Dentre as regiões de estudo, denominadas de 1 e 2, foi observada uma diferente taxa de variação de nucleotídeos. A região 1, que compreende os nucleotídeos 1 a 313, apresentou-se altamente conservada, enquanto que

na região 2, que compreende os nucleotídeos 603 – 1053 (GenBank: EU109281.1), foi possível identificar seis polimorfismos. Ao consultar-se a base de dados do NCBI (número de acesso no GenBank ABO82576.1, referente à sequência “APOBEC3H [*Felis catus*]”), verificou-se que, embora tanto dentro da região 1 quanto da região 2 se encontram porções inseridas no domínio catalítico de deaminação – fundamental para a atividade geradora de hipermutações no genoma viral – a região 1 possui grande parte dos resíduos relacionados com os sítios ativos dentro desse domínio (como os aminoácidos nas posições 27, 29, 47 e 49 (Münk et al., 2008)). No presente estudo, esses aminoácidos apresentaram-se idênticos entre todas as sequências analisadas. Em outras espécies foi demonstrado que alterações nessa região do gene *A3H* afetam de forma importante a função da proteína. Em humanos, por exemplo, a deleção $\Delta 15$, encontrada na região N-terminal do gene *A3H*, homóloga à região 1 do nosso estudo, foi responsável pela perda da função dessa proteína em uma parcela da população durante a evolução humana recente (OhAinle et al., 2008). Especula-se que o alto grau de conservação observado nessa região, descrito no presente estudo, esteja de fato ligado à importância dessa região para a função da proteína. Entretanto, para comprovação dessa hipótese, estudos *in vitro* devem ser realizados, por exemplo, realizando-se mutações dentro dessa região e observando seu efeito sobre a replicação viral.

Muito embora resíduos presentes na região 2 também participem do domínio catalítico, os polimorfismos encontrados nesse trabalho não correspondem aos resíduos localizados dentro dos sítios ativos, esse fato possivelmente está positivamente relacionado com a maior variação observada

na região. Entre os seis pontos de variação classificados como polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) dentro da região 2, em dois deles não foi possível observar o genótipo homocigoto mutante. Hipóteses para explicar essa ausência seria talvez devido ao baixo número amostral ou então, quem sabe, ao fato de que duas cópias dessa proteína modificada poderiam gerar uma condição não favorável para o animal. Uma troca de aminoácidos na posição 65 já havia sido observada em outra espécie de felino, o Tigre da Indochina (Münk et al., 2008), indicando que essa posição possivelmente encontra-se mais permissível quanto à variação. Interessantemente, a troca A65S, foi correlacionada, em nosso estudo, com uma maior susceptibilidade à infecção por FIV e FeLV quando o genótipo “TT” é apresentado (ou seja, o animal apresenta a troca para o códon codificador da Serina em ambas as cópias do gene). A troca A65I concomitantemente com a A65S, gerando o genótipo “TA” também apresentou uma correlação significativa quanto à susceptibilidade à infecção, todavia apenas quando os animais positivos para FIV e/ou FeLV eram analisados como um único grupo. A baixa frequência encontrada desse genótipo na população de estudo pode ser a resposta para o porquê dessa correlação não ter sido encontrada quando os dois vírus eram analisados separadamente e, sendo assim, um estudo mais robusto com um número maior de animais analisados pode fornecer dados mais concretos. Contudo, a proximidade do resíduo 65 com resíduos destacados como importantes dentro do sítio catalítico no banco de dados NCBI (62, 63, 64 e 66) pode ajudar a explicar a correlação encontrada entre a troca de aminoácidos nessa posição e a susceptibilidade à infecção. É de conhecimento geral que trocas de

aminoácidos, ainda mais quando estes possuem diferentes propriedades, podem afetar a estrutura tridimensional da proteína e, até talvez, sua atividade (como é o caso da troca da Alanina (um aminoácido apolar) pela Serina (aminoácido polar neutro)). Com base nos resultados estatísticos encontrados nesse trabalho, torna-se interessante um estudo *in vitro* para determinação da atividade da A3H felina considerando mutações na posição 65, em especial os polimorfismos aqui destacados.

Ao analisar os haplótipos presentes na população, encontrou-se dez combinações, sendo “GGGGCT” o haplótipo mais frequente, seguido de “TGGGCC”, enquanto que os outros foram observados em frequências bem mais baixas. Tal resultado pode ser explicado devido ao fato de que os seis polimorfismos estão segregando juntos, em desequilíbrio de ligação.

Sabe-se que, para o gene *A3H* humano, determinados haplótipos influenciam tanto na atividade da proteína quanto em sua sublocalização celular, sendo que alguns codificam uma A3H completamente inativa (Harari et al., 2009; Li & Emerman, 2011; OhAinle et al., 2008). Tendo em vista estas informações, da mesma forma como foi feito para cada polimorfismo, tentou-se correlacionar a presença dos haplótipos encontrados com a susceptibilidade às infecções virais por FIV e/ou FeLV. O haplótipo “GGGGCC” foi relacionado com a ausência de infecção viral, estando presente em maior número no grupo de animais negativos, sugerindo um possível efeito protetor dessa combinação alélica em relação à infecção pelos retrovírus felinos analisados. É interessante observar que, de acordo com os resultados encontrados anteriormente, tal combinação não apresenta os genótipos “TT” ou “TA” na primeira posição, que,

a princípio, parecem conferir maior susceptibilidade à infecção por FIV e/ou FeLV. No entanto, da mesma forma como foi anteriormente comentado para a mutação A65I, seriam interessantes mais estudos, com um maior número de indivíduos, para que os dados dissertados nesse trabalho possam ser corroborados, e também para avaliar os efeitos dessas determinadas combinações em relação ao papel restritivo da proteína, através de estudos *in vitro* ou até mesmo *in silico*.

8. Conclusões

No presente trabalho buscou-se determinar a variação na sequência de nucleotídeos do gene *A3H* a partir de amostras de sangue de *Felis catus* infectados ou não com FIV e/ou FeLV. Dentre as duas regiões do gene *A3H* analisadas, somente em uma foram encontrados polimorfismos – ou SNPs - (dentro do segundo éxon traduzível do gene), sendo o SNP S65A(S65I) correlacionado positivamente com uma maior susceptibilidade à infecção por FIV e/ou FeLV. Analisando-se os haplótipos formados pelos seis SNPs descobertos, encontraram-se dez combinações, e “GGGGCC” obteve uma correlação significativa com a ausência de infecção viral. Levando em consideração os resultados aqui descritos, propõe-se que mais estudos com enfoque no polimorfismo A65S(A65I) (correlacionado significativamente com susceptibilidade à infecção viral) e sua concomitante ausência no genótipo “GGGGCC” (por sua vez, correlacionado com um possível efeito protetor) podem auxiliar na construção de um maior conhecimento a respeito da interação entre o gato doméstico e os retrovírus em questão. Tanto estudos

realizados em *in vitro*, como, por exemplo, produção sintética das variantes da proteína A3H de interesse e visualização de seus efeitos através de ensaios de infecção viral e contagem de hipermutações presentes no genoma proviral, ou ainda estudos *in silico*, como modelagem e dinâmica molecular, podem auxiliar nessa compreensão.

Ressalta-se aqui que este é o primeiro estudo realizado cujo enfoque principal foi a busca por polimorfismos dentro da espécie *Felis catus* através do sequenciamento de diversas amostras de gatos domésticos infectados ou não. Da mesma forma, é o primeiro trabalho que visa relacionar esses polimorfismos com susceptibilidade ou não à infecção por FIV e FeLV. Trabalhos visando uma melhor compreensão da interação entre microrganismos e hospedeiros podem auxiliar para que se alcance um maior conhecimento e posterior controle e tratamento da infecção.

9. Referências

- ADOLPH, M.B.; WEBB, J.; CHELICO, L. Retroviral restriction factor APOBEC3G delays the initiation of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase. **PLoS One**, San Francisco, v.8, n.5, e. 64196, maio 2013.
- AKHTARDANESH, B.; ZIAALI, N.; SHARIFI, H.; REZAEI, S. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. **Research in Veterinary Science**, London, v. 89, n. 2, p. 306–310, out. 2010.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.9, p. 3448–3449, set. 2000.
- BARR, A.C. FIV and FIV-related diseases. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C., **Veterinary Internal Medicine**. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000. p.433–438.
- BERGER, A.; SOMMER, A.F.; ZWARG, J. HAMDORF, M.; WELZEL, K.; ESLY, N.; PANITZ, S.; REUTER, A.; RAMOS, I.; JATIANI, A.; MULDER, L.C.; FERNANDEZ-SESMA, A.; RUTSCH, F.; SIMON, V.; KÖNIG, R.; FLORY, E. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutieres syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 12, dez. 2011.
- BERTHOUX, L.; SEBASTIAN, S.; SAYAH, D.M.; LUBAN, J. Disruption of human TRIM5a antiviral activity by nonhuman primate orthologues. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 12, p. 7883–7888, jun, 2005.
- BISHOP, K.N.; HOLMES, R.K.; SHEEHY, A.M.; MALIM, M.H. APOBEC-mediated editing of viral RNA. **Science**, New York, v. 305, n. 5684, p. 645, jul. 2004.
- BROWN, W.E.; OLMSTED, R.A.; MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. Exposure to FIV and FIPV in wild and captive cheetahs. **Zoo Biology**, New York, v.12, n. 1, p. 135-142, 1993.
- BULL, M.E.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; LEVINE, J.F.; LOOMIS, M.; GEBHARD, D.G.; TOMPKINS, W.A. Evaluation of T lymphocytes in captive African lions (*Panthera leo*) infected with feline immunodeficiency virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 1293–1300, out. 2003.
- CARPENTER, M.A.; O'BRIEN, S.J. Coadaptation and immunodeficiency virus: lessons from the Felidae. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 5, n. 6, p. 739-745, dez. 1995.
- CAXITO, F.A.; COELHO, F.M.; OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strain from State of Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1222-1225, dez. 2006.

CEN, S., GUP, F.; NIU M.; SAADATMAND, J.; DEFLASSIEUX, J.; KLEIMAN, L. The interaction between HIV-1 gag and APOBEC3G. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 32, p. 33177–33184, ago. 2004.

CHANDHASIN, C.; LOBELLE-RICH, P.A.; LEVY, L.S. Feline leukemia virus LTR variation and disease association in a geographic and temporal cluster. **The Journal of General Virology**, London, v. 85, n. pt 10, p. 2937–2942, out. 2004.

CONTICELLO, S.G.; THOMAS, C.J.; PETERSEN-MAHRT, S.K.; NEUBERGER, M.S.; Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 22, n. 2, p. 367–377, fev. 2005.

COSTA, U.M.; REISCHAK, D.; SCHMITT, A.C.; RENCK, L.; OLIVEIRA, E.S.; FERREIRO, L. Detection of feline leukemia virus (FeLV) antigen from 1992 to June 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Virus Reviews & Research**, São Paulo, v.5, p. 94, 2000.

COTTER, S.M. Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 199, n. 10, p. 1470–1473, nov. 1991.

COTTER, S.M. Feline viral neoplasia. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 491–513.

DANG, Y.; WANG, X.; ESSELMAN, W.J.; ZHENG, Y.H. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 21, p.10522–10533, nov. 2006.

DANG, Y.; SIEW, L.M.; WANG, X.; HAN, Y.; LAMPEN, R.; ZHENG, Y.H. Human Cytidine Deaminase APOBEC3H Restricts HIV-1 Replication. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 17, p. 11606–11614, abr. 2008.

DE ALMEIDA, N.R.; DANELLI, M.G.; DA SILVA, L.H.; HAGIWARA, M.K.; MAZUR, C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v.14, n.8, p. 583–586, ago. 2014.

DUARTE, A.; TAVARES, L. Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency Virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n.1–2, p. 25–33, abr. 2006.

DONAHUE, P.R.; QUACKENBUSH, S.L.; GALLO, M.V.; DENORONHA, C.M.; OVERBAUGH, J.; HOOVER, E.A.; MULLINS, J.I. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 4461–4469, ago. 1991.

FINOKETTI, F.; CAMPOS, F.S.; OLIVEIRA, M.T.; OLIVEIRA, G.C.; GOMES, C.W.C.; CONRADO, F.O.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Development of a PCR to detect proviral DNA of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) in cats. (Em fase de elaboração)

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia geral e doenças víricas**. 2. ed, Santa Maria: Editora UFSM, 2012.

GENTILE, G.; AYALA, I.; PIETRA, M. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina: estudio seroepidemiológico y clínico en Bologna (Italia). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago, v. 28, n. 2, p. 153-156, ago. 1996.

GOTO, Y.; NISHIMURA, Y.; MIZUNO, T.; ENDO, Y.; BABA, K.; MOMOI, Y.; WATARI, T.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n. 12, p. 1609–1613, dez. 2000.

HAGIWARA, M.K.; RECHE JUNIOR, A.; DAGLI, M.L.Z. Feline immunodeficiency virus infection in cats from Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.30, n. supl, p. 217-220, jan. 1993.

HARARI, A.; OOMS, M.; MULDER, L.C.; SIMON, V. Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 1, p. 295-303, jan. 2009.

HARBOUR, D.A.; GUNN-MOORE, D.A.; GRUFFYDDJONES, T.J.; CANEY, S.M.; BRADSHAW, J.; JARRETT, O.; WISEMAN, A. Protection against oronasal challenge with virulent feline leukaemia virus lasts for at least 12 months following a primary course of immunisation with LeukocellTM 2 vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, n. 23-24, p. 2866-2872, jul. 2002.

HARTMANN, K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 11, p. 2684–2710, nov. 2012

HOFMANN-LEHMANN, R.; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; RIOND, B.; PEPIN, A.C.; WILLI, B.; OSSENT, P.; LUTZ, H. Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. **Vaccine**, Amsterdam, v.25, n.30, p. 5531-5539, jul 2007.

HOFMANN-LEHMANN, R.; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; RIOND, B.; LUTZ, H. How molecular methods change our views of felv infection and vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p.119-123, maio 2008.

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

HOOVER, E.A.; MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 199, n. 10, p. 1287-1297, nov. 1991.

HRECKA, K.; HAO, C.; GIERSZEWSKA, M.; SWANSON, S.K.; KESIK-BRODACKA, M.; SRIVASTAVA, S.; FLORENS, L.; WASHBURN, M.P.; SKOWRONSKI, J. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. **Nature**, London, v. 44, n. 7353, p. 658–661, jun 2011.

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

JARMUZ, A.; CHESTER, A.; BAYLISS, J.; GISBOURNE, J.; DUNHAM, I.; SCOTT, J.; NAVARATNAM, N. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. **Genomics**, San Diego, v. 79, n. 3, p. 285–296, mar. 2002.

JÓNSSON, S.R.; ANDRÉSDÓTTIR, V. Host restriction of lentiviruses and viral countermeasures: APOBEC3 and Vif. **Viruses**, Basel, v. 5, n. 8, p. 1934-1947, jul 2013.

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

KELLY, P.J.; STOCKING, R.; GAO, D.; PHILLIPS, N.; XU, C.; KALTENBOECK, B.; WANG, C. Identification of feline immunodeficiency virus subtype-B on St. Kitts, West Indies by quantitative PCR. **Journal of Infection in Developing Countries**, Italy, v. 5, n. 6, p.480–483, jul. 2011.

KENYON, J.C.; LEVER, A.M.L. The Molecular Biology of Feline Immunodeficiency Virus (FIV). **Viruses**, Basel, v. 4, n. 11, p. 2192-2213, nov. 2011.

KINOMOTO, M.; KANNO, T.; SHIMURA, M.; ISHIZAKA, Y.; KOJIMA, A.; KURATA, T.; SATA, T.; TOKUNAGA, K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 9, p. 2955–2964, abr. 2007.

KIRCHHOFF F. Immune Evasion and Counteraction of Restriction Factors by HIV-1 and Other Primate Lentiviruses. **Cell Host & Microbe**, Massachusetts, v. 8, n. 1, p. 55-67, jul. 2010.

LAGUETTE, N.; SOBHIAN, B.; CASARTELLI, N.; RINGEARD, M.; CHABLE-BESSIA, C.; SEGERAL, E.; YATIM, A.; EMILIANI, S.; SCHWARTZ, O.; BENKIRANE, M. SAMHD1 is the dendritic and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. **Nature**, London, v. 474, n. 7353, p. 654–657, maio 2011.

LARA, V.M.; SUELI, A.; TANIWAKI, A.S.; ARAÚJO JR, J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 11, p. 467-470, nov. 2007.

LARUE, R.S.; JONSSON, S.R.; SILVERSTEIN, K.A.; LAJOIE, M.; BERTRAND, D.; EL-MABROUK, N.; HOTZEL, I.; ANDRES DOTTIR, V.; SMITH, T.P.; HARRIS, R.S. The artiodactyl APOBEC3 innate immunorepertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. **BMC Molecular Biology**, London, v. 9, n. 104, nov. 2008.

LARUE, R.S.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; BLANCHARD, Y.; CONTICELLO, S.G.; DERSE, D.; EMERMAN, M.; GREENE, W.C.; JÓNSSON, S.R.; LANDAU, N.R.; LÖCHELT, M.; MALIK, H.S.; MALIM, M.H.; MÜNK, C.; O'BRIEN, S.J.; PATHAK, V.K.; STREBEL, K.; WAIN-HOBSON, S.; YU, X.F.; YUHKI, N.; HARRIS, R.S. Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 2, p. 494–497, jan. 2009.

LARUE, R.S.; LENGYEL, J.; JÓNSSON, S.R.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; HARRIS, R.S. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 16, p. 8193-201, ago. 2010.

LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 228, n. 3, p. 371–376, fev. 2006.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E.; THAYER, V. 2008 american association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 10, n. 3, p. 300-316, jul. 2008.

LI MM, EMERMAN M. Polymorphism in Human APOBEC3H Affects a Phenotype Dominant for Subcellular Localization and Antiviral Activity. **Journal of Virology**, Washington, v. 85, n. 16, p. 8197-8207, ago. 2011.

LITTLE, S.; SEARS, W.; LACHTARA, J.; BIENZLE, D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 50, n. 6, p. 644–648, jun. 2009.

LUO, K.; LIU, B.; XIAO Z., YU, Y.; YU, X.; GORELICK, R.; YU, X.F. Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 21, p.11841–11852, nov. 2004.

LUTZ, H. Feline retroviruses: a brief review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 1-4, p. 131-146, jun. 1990.

LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LLORET, A.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v.11, n.7, p. 565–574, jul. 2009.

LYER, D.; LEROY, B.E.; LATIMER, K.S.; MOORE, H. **Feline Leukemia virus infection – a review**. 2005. College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA.

MALIK, R.; KENDALL, K.; CRIDLAND, J.; COULSTON, S.; STUART, A.J.; SNOW, D.; LOVE, D.N. Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 75, n. 5, p. 323–327, maio 1997.

MARÇOLA, T.G.; GOMES, C.P.; SILVA, P.A.; FERNANDES, G.R.; PALUDO, G.R.; PEREIRA, R.W. Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. **Virus Genes**, Boston, v. 46, n. 3, p. 546-550, jun. 2013.

MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; NAKAO, R.; TANAKA, S.; SAKAI, T.; XUAN, X.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. Seroprevalence of Bartonella henselae, Toxoplasma gondii, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. **Microbiology and Immunology**, Richmond, v.47, n. 2, p. 147–153, jul. 2003.

MERCENNE, G.; BERNACCHI, S.; RICHER, D.; BEC, G.; HENRIET, S.; PAILLART, J.C.; MARQUET, R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Research*, London, v. 38, n. 2, p. 633-46, jan 2010.

MÜNK, C.; BECK, T.; ZIELONKA, J.; HOTZ-WAGENBLATT, A.; CHAREZAS, S.; BATTENBERG, M.; THIELEBEIN, J.; CICHUTEK, K.; BRAVOY, I.G.; O'BRIEN, S.J.; LÖCHELTS, M.; YUHKI, N. Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes **Genome Biology**, London, v.9, n.3, p. R48, nov. 2008.

MÜNK, C.; HECHLER, T.; CHAREZA, S.; LÖCHELT, M. Restriction of feline retroviruses: Lessons from cat APOBEC3 cytidine deaminases and TRIM5a proteins **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 134, n.1-2, p. 14–24, mar. 2010.

MÜNK, C.; WILLEMSSEN, A.; BRAVO, I.G. An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 12, n. 71, maio 2012.

NEIL, S.J.; ZANG, T.; BIENIASZ, P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature**, London, v. 451, n. 7177, p. 425–430, jan 2008.

NORRIS, J.M.; BELL, E.T.; HALES, L.; TORIBIO, J.A.; WHITE, J.D.; WIGNEY, D.I.; BARAL, R.M.; MALIK, R. Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 9, n.4, p.300–308, ago. 2007.

OHAINLE, M.; KERNS, J.A.; MALIK, H.S.; EMERMAN, M. Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 8, p. 3853–3862, abr. 2006.

OHAINLE, M.; KERNS, J.A.; LI, M.M.; MALIK, H.S.; EMERMAN, M. Antiretroelement activity of APOBEC3H was lost twice in recent human evolution. **Cell Host & Microbe**, Massachusetts, v. 4, n. 3, p.249-259, set. 2008.

OHNO S. **Evolution by gene duplication**. 1. ed. New York: Springer, 1970.

OLMSTED, R.A.; LANGLEY, R.; ROELKE, M.E.; GOEKEN, R.M.; ADGER-JOHNSON, D.; GOFF, J.P.; ALBERT, J.P.; PACKER, C.; LAURENSEN, M.K.; CARO, T.M. Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. **Journal of Virology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 6008-6018, out. 1992.

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

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

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

PEPIN, A.C.; TANDON, R.; CATTORI, V.; NIEDERER, E.; RIOND, B.; WILLI, B.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral rna in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. **Virus Research**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 9-16, jul. 2007.

ROGOZIN, I.B.; BASU, M.K.; JORDAN, I.K.; PAVLOV, Y.I.; KOONIN, E.V. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 4, n. 9, p. 1281–1285, set. 2005.

SAKAI, K.; DIMAS, J.; LENARDO, M.J. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 9, p. 3369–3374, fev. 2006.

SCHÄFER, A.; BOGERD, H.P.; CULLEN, B. R. Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor,” **Virology**, New York, v. 328, n. 2, p. 163–168, out. 2004.

SCHROFELBAUER, B.; YU, Q.; LANDAU, N.R. New insights into the role of Vif in HIV-1 replication. **AIDS Reviews**, Barcelona, v. 6, n. 1, p. 34–39, jan-mar. 2004.

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

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

STEINRIGL, A.; KLEIN D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. **Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 5, p. 1301-1307, maio 2003.

STREMLAU, M.; OWENS, C.M.; PERRON, M.J.; KIESSLING, M.; AUTISSIER, P.; SODROSKI, J. The cytoplasmic body component TRIM5 alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. **Nature**, London, v. 427, n. 6977, p. 848–853, fev. 2004.

TEIXEIRA, B.M.; RAJÃO, D.S.; HADDAD, J.P.A.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.4, p. 939-942, jan. 2007.

TEIXEIRA, B.M.; HAGIWARA, M.K.; CRUZ, J.C.; HOSIE, M.J. Feline Immunodeficiency Virus in South America. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 3, p.383-396, mar. 2012.

TOHYA, Y.; CASTELLANO, M.C.; NORIMINE, J.; ETCHEVERRIGARAY, M.E. Anticuerpos contra el virus da la inmunodeficiencia felina: Primeira comprobacion en Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, v.75, p. 242-246, mar. 1994.

TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time pcr. **Virology**, New York, v. 332, n. 1, p. 272-283, fev. 2005.

TROYER, J. L., J. PECON-SLATTERY, M. E. ROELKE, W. JOHNSON, S. VANDEWOUDE, N. VAZQUEZ-SALAT, M. BROWN, L. FRANK, R. WOODROFFE, C. WINTERBACH, H. WINTERBACH, G. HEMSON, M. BUSH, K. A. ALEXANDER, E. REVILLA, AND S. J. O'BRIEN. Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8282–8294, jul. 2005.

VIRGEN, C.A.; HATZIOANNOU, T. Antiretroviral activity and Vif sensitivity of rhesus macaque APOBEC3 Proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 24, p. 13932–13937, dez. 2007.

WANG, X.; HAN, Y.; DANG, Y.; FU, W.; ZHOU, T.; PTAK, R.G.; ZHENG, Y.H. Moloney leukemia virus 10 (MOV10) protein inhibits retrovirus replication. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 19, p. 14346–14355, maio 2010.

WEDEKIND, J.E.; DANCE, G.S.; SOWDEN, M.P.; SMITH, H.C. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 207–216, abr. 2003.

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

ZHENG, Y.H.; JEANG, K.T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. **Retrovirology**, London, v. 9, n. 112, dez. 2012.