

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

FILODINÂMICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA NO BRASIL ANÁLISE
DE SEQUÊNCIAS DOS GENES VIRAIS *VIF* E *ENV* E DO GENE *A3Z3* EM FELINOS
DOMÉSTICOS NATURALMENTE INFECTADOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE.

LUCÍA CANO ORTIZ

Porto Alegre

2017

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

FILODINÂMICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA NO BRASIL E ANÁLISE
DE SEQUÊNCIAS DOS GENES VIRAIS *VIF* E *ENV* E DO GENE *A3Z3* EM FELINOS
DOMÉSTICOS NATURALMENTE INFECTADOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE.

LUCÍA CANO ORTIZ

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre
em Ciências Veterinárias, especialidade
Virologia
Orientadora: Ana Cláudia Franco**

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Cano-Ortiz, Lucía
FILODINÂMICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA
NO BRASILE ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DOS GENES VIRAIS
VIF E ENV E DO GENE A3Z3 EM FELINOS DOMÉSTICOS
NATURALMENTE INFECTADOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE. /
Lucía Cano-Ortiz. -- 2017.
95 f.
Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Vírus da Imunodeficiência Felina. 2. Subtipo B.
3. Relógio Molecular. 4. Recombinação. 5. APOBEC3. I.
Franco, Ana Cláudia, orient. II. Título.

LUCÍA CANO ORTIZ

Filodinâmica do vírus da imunodeficiência felina no Brasil e análise de sequências dos genes virais *vif* e *env* e do gene *A3Z3* em felinos domésticos naturalmente infectados na cidade de Porto Alegre.

Aprovado em 22 de fevereiro de 2017

Aprovado por

Professora Dra. Ana Cláudia Franco
Orientadora

Professor Dr. José Artur Bogo Chies
Membro da Comissão

Professor Dr. Fabrício Souza Campos
Membro da Comissão

Dra. Rubia Marília de Medeiros
Membro da Comissão

Aos meus pais e à Ana

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Esperanza e Iván, pelo amor, por ser minha luz, pelo esforço e apoio incondicional. Ao meu irmão David, por ser meu presente mais querido, a minha Tita, pelo amor e apoio.

Ao meu tio e meus primos, pelo amor e por torcer por mim sempre.

À minha professora de português Sara Mejía Botero, por ensinar com amor e compartilhar comigo mais de uma paixão.

Aos meus amigos, professores e mestres na Colômbia e no Brasil, por torcer por mim, pela constância e pelos conselhos.

Aos ausentes, cujo abraço permanece na memória.

À família Franco: Joaquim, Henrique, Gatito, Ilka e Cláudio, por me fazer parte da família, pelo carinho, companhia e voto de confiança.

Aos colegas do laboratório Carol, Raissa, Rayra e Fernando, pela amizade, por me fazer sentir tão bem acolhida em Porto Alegre e pela ajuda fornecida.

À Cristina Santos e ao André Zani, que contribuíram com seus conhecimentos e experiências.

À professora Fernanda Amorim e a Naila Duda, por se disponibilizarem a ajudar neste trabalho.

Ao professor Paulo Roehe, por me receber no grupo e pelo apoio fornecido.

À Juliana Comerlato, pela amizade e o carinho, pelo apoio nos experimentos, pela ajuda e ensinamentos.

Ao professor Dennis Maletich Junqueira, pelas indispensáveis contribuições neste trabalho, por compartilhar seu conhecimento e pelo grande carisma.

E especialmente à minha orientadora Ana, pela oportunidade e orientação. Por me receber na sua família, pela ajuda disponibilizada durante todo o mestrado, pela amizade, carinho e companhia.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Esperanza e Iván por el amor, por ser mi luz, por su esfuerzo y apoyo incondicionales. A mi hermano David, por ser mi regalo más querido. A mi Tita, por el amor y apoyo.

A mi tío y mis primos, por el amor y aliento.

A mi profesora de portugués, Sara Mejía Botero, por enseñar con amor y compartir conmigo más de una pasión

A mis amigos, profesores y maestros en Colombia y en Brasil, por alentarme, la constancia y los consejos.

A los ausentes, cuyo abrazo permanece en la memoria.

A la familia Franco: Joaquim, Henrique, Gatito, Ilka e Cláudio, por hacerme parte de la familia, por el cariño, la compañía y por el voto de confianza.

A los compañeros del laboratorio Carol, Raissa, Rayra e Fernando, por la amistad, por hacerme sentir tan bien acogida en Porto Alegre y por la ayuda proporcionada.

A Cristina Santos e André Zani que contribuyeron con sus conocimientos e experiencias.

A la profesora Fernanda Amorim y a Naila Duda por su disponibilidad para ayudar en este trabajo.

Al profesor Paulo Roehe, por recibirme en el grupo y por el apoyo.

A Juliana Comerlato por la amistad y el cariño, por el apoyo en los experimentos, por la ayuda y enseñanzas proporcionadas.

Al profesor Dennis Maletich Junqueira, por las indispensables contribuciones en este trabajo, por compartir sus conocimientos y por su gran carisma.

A mi orientadora, Ana por la oportunidad y orientación. Por recibirme en su familia, por la ayuda durante toda la maestría, por la amistad, cariño y compañía.

BUTT.  Vogliate-mi be - ne. - Noi siamo gente avvezza alle picco - le

BUTT.  co - se u - mi - lie si - len - zio - se, adu - na te - ne - rez - za sfiorante e pur pro - fon - da come il

BUTT.  ciel, come l'onda del ma - rel'

PINK.  *con anima*
Dam - mi ch'io ba - ci le tue mani

(Giacomo Puccini, 1907)

*«Viens, mon beau chat, sur mon cœur amoureux;
Retiens les griffes de ta patte,
Et laisse-moi plonger dans tes beaux yeux
Mêlés de métal et d'agate.»*

(Charles Baudelaire, 1857)

RESUMO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV), membro da família *Retroviridae*, é um vírus mundialmente distribuído em gatos domésticos. Até o momento foram descritos sete subtipos de FIV em várias regiões do mundo. No Brasil, os estudos revelam a presença unicamente do subtipo B do FIV (FIV-B). Entretanto, o baixo número de sequências genômicas disponíveis nos bancos de dados dificulta a realização de estudos filogenéticos. Com a finalidade de compreender melhor alguns aspectos da epidemiologia molecular de FIV, trinta e uma amostras de gatos positivos para FIV, coletadas entre 2012 e 2016 no município de Porto Alegre-RS, foram submetidas à amplificação e sequenciamento da região C5-V4 do gene *env*, importante na subtipificação viral. Todas as sequências obtidas pertencem ao FIV-B. No entanto, 4 sequências (13 %) apresentaram um agrupamento diferente das demais, confirmando a ocorrência de eventos de recombinação. Além disso, observou-se a existência de cinco clados altamente suportados nas sequências brasileiras, sugerindo cinco eventos independentes de introdução do vírus no Brasil. Por fim, os resultados obtidos sugerem que a epidemia de FIV-B se remonta a 1942 e, no Brasil, as cinco entradas do vírus aconteceram entre 1981-1991. Além disso, foi feita uma análise visando compreender a relação entre a frequência de mutações nos genes *env* e *vif* do FIV e gene *A3Z3* do hospedeiro, um importante fator de restrição que induz hipermutações no vírus. Foram identificados 5 dos 7 haplótipos no gene *A3Z3* descritos previamente e se encontrou um baixo ou indetectável nível de hipermutações nos genes virais analisados.

Palavras chave: Vírus da Imunodeficiência Felina. Subtipo B. Relógio Molecular. Recombinação. APOBEC3.

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV), a member of the Retroviridae family, is a widespread virus in domestic cats. To date, seven FIV subtypes have been described in different regions of the world. In Brazil, the studies show only the presence of FIV subtype B (FIV-B). However, the low number of available genomic sequences in the databases is a challenge for phylogenetic studies. In order to better understand some aspects of the molecular epidemiology of FIV, thirty-one samples of FIV positive cats collected between 2012 and 2016 in Porto Alegre-RS, were submitted to amplification and sequencing of the C5-V4 region of the env gene, used to viral subtyping. All sequences obtained belong to FIV-B. However, 4 sequences (13%) presented a different grouping pattern when compared to other sequences, confirming the occurrence of recombination events. In addition, we observed the existence of five clades highly supported in the Brazilian sequences, suggesting five independent events of introduction of the virus in Brazil. Finally, the results obtained suggest that the FIV-B epidemic dates back to 1942 and, in Brazil, the five entries of the virus occurred from 1981 to 1991. In addition, an analysis was developed to understand the relationship between the frequency of mutations in the env and vif genes of the virus and A3Z3 host gene, an important restriction factor that induces hypermutations in the virus. Five of the 7 haplotypes in the A3Z3 gene described previously were identified and a low or undetectable level of hypermutations was found in the analyzed viral genes.

Keywords: Feline Immunodeficiency Virus. FIV-B. Molecular Clock. Recombination. APOBEC3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 -	Árvore filogenética de FIV em diferentes espécies da família <i>Felidae</i> e <i>Hyaenidae</i> baseado no gene <i>pol</i>	17
Figura 2 -	Esquema ilustrativo do curso da infecção pelo FIV.....	20
Figura 3 -	Estrutura do vírion HIV.....	23
Figura 4 -	Organização genômica do vírus da imunodeficiência felina.....	24
Figura 5 -	Ciclo replicativo dos retrovírus.....	25
Figura 6 -	Processo de fusão de membranas entre o HIV (modelo de estudo de retrovírus) e célula.....	26
Figura 7-	Etapas da transcrição reversa.....	27
Figura 8-	Representação bidimensional das proteínas do envelope do FIV....	29
Figura 9-	Regiões variáveis da proteína do envelope.....	29
Figura 10-	Árvore filogenética de sequências de V3-V5 do gene <i>env</i> , indicando os subtipos e o país de procedência.....	31
Figura 11 -	Mecanismo antirretroviral da proteína A3G.....	34
Figura 12-	Representação esquemática dos genes de A3 em diferentes espécies de mamíferos.....	35
Figura 13-	Representação das regiões codificantes de A3 no cromossomo B4 do genoma de <i>Felis catus</i>	36

ARTIGO 1

Figura 1 -	Maximum likelihood phylogenetic tree of 77 FIV <i>env</i> sequences of six subtypes (A-F)	47
Figura 2 -	Bootscreening plots of four FIV recombinant sequences sampled across Rio Grande do Sul, Brazil.....	48
Figura 3 -	Bayesian phylogenetic tree of 74 FIV subtype B <i>env</i> Brazilian sequences.....	49
Figura S1 -	Maximum likelihood phylogenetic tree of 237 FIV subtype B <i>env</i> sequences from around the world.....	55

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 -	Prevalência do FIV em gatos domésticos nos países estudados.....	18
Tabela 2 -	Prevalência do FIV em gatos domésticos nos estados do Brasil estudados.....	19

ARTIGO 1

Tabela S1 -	Identification of the domestic cats samples used in this study, in Porto Alegre-RS, Brazil, between 2012 and 2016, GenBank accession numbers, dates of collection and references of the Figure 3.....	55
Tabela S2 -	Sequences used in this study, accession number, country of origin and subtype.....	56
Tabela S3 -	Sequences of Brazilian FIV of domestic cats, accession number and state of origin used for the analyses.....	58

ARTIGO 2

Tabela 1 -	Polymorphisms, genotypes and frequencies in the A3Z3 from FIV positive cats in Porto Alegre city.	80
Tabela 2 -	Haplotypes and frequencies of the A3Z3 gene found in the studied population of FIV positive cats in Porto Alegre city and comparison of frequencies with the previous study in the same conditions.	80
Tabela S1 -	Primers used in this study to amplify proviral genes (<i>env</i> and <i>vif</i>) from exon 3 of A3Z3 positives cats to FIV.....	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Vírus da Imunodeficiência Felina.....	16
2.1.1	Histórico.....	16
2.1.2	Epidemiologia.....	16
2.1.3	Patogênese e curso da infecção pelo FIV.....	19
2.1.4	Diagnóstico.....	21
2.1.5	Tratamento.....	22
2.1.6	Prevenção.....	22
2.2	Biologia molecular do vírus da imunodeficiência felina.....	23
2.2.1	Classificação, caracterização molecular e estrutural.....	23
2.2.2	Mecanismo intracelular de replicação.....	25
2.2.3	Proteína de envelope (Env) e subtipos virais.....	28
2.2.4	Fator de Infectividade Viral (Vif)	32
2.3	Fatores de restrição.....	32
2.3.1	APOBEC3.....	32
2.3.2	APOBEC3 e Vif felinos.....	35
3	ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	37
4	ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	61
5	DICUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÕES.....	84
	BIBLIOGRAFIA.....	85

1 INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é membro da família *Retroviridae*, um vírus mundialmente distribuído de grande importância em medicina veterinária. A doença causada pelo FIV acomete diversas espécies de felídeos, entre elas, o gato doméstico, os quais apresentam quadros clínicos variáveis, relacionados com infecções oportunistas, neoplasias e doenças neurológicas. No entanto, muitos animais naturalmente infectados não manifestam sintomatologia clínica severa; e podem ter uma sobrevida longa com acompanhamento veterinário e cuidados apropriados.

Pouco se conhece sobre a patogênese da doença devido à variabilidade dos sintomas, e a variação genômica apresentadas. Atualmente, existem poucas sequências genômicas disponíveis nos bancos de dados das variantes virais, o que dificulta a realização de estudos filogenéticos. Sendo assim, um dos objetivos do trabalho foi realizar uma análise filogenética das amostras do Brasil a partir de novas sequências aqui geradas e de sequências-referência depositadas no GenBank, visando a contribuição no estudo da epidemiologia molecular do FIV no Brasil.

Além disso, o outro objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre variações na sequência do gene APOBEC3 (A3) e presença de hipermutações nos genes *env* e *vif* de animais FIV positivos. A3 é um fator de restrição contra infecções retrovirais, e induz mutações no DNA proviral durante a etapa de transcrição reversa. Alguns polimorfismos em A3 descritos em gatos naturalmente infectados estariam correlacionados com resistência ou suscetibilidade à infecção pelo FIV, e diferentes haplótipos já foram testados *in vitro* confirmando esta possível correlação. No entanto, se desconhece o efeito direto dos haplótipos de A3 na população viral dos animais infectados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da Imunodeficiência Felina

2.1.1 Histórico

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi isolado pela primeira vez em 1986 em Petaluma, Califórnia, em animais negativos para o vírus da leucemia felina (FeLV) que apresentaram sintomatologia similar à imunodeficiência observada em humanos causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O FIV foi inicialmente denominado “vírus T-Linfotrópico felino” por ter sido isolado de linfócitos de sangue periférico e por apresentar tropismo pelas células T *in vitro* (PEDERSEN, N. C. *et al.*, 1987). Posteriormente em 1988, foi denominado “vírus da imunodeficiência felina”, quando foi comprovada quando foi comprovada sua associação com a ocorrência de imunodeficiência em gatos infectados experimentalmente (YAMAMOTO, J. *et al.*, 1988).

2.1.2 Epidemiologia

O FIV acomete uma grande variedade de espécies pertencentes às famílias *Felidae* (35 espécies) e *Hyaenidae* (3 espécies) (Figura 1); entre elas gatos domésticos (*Felis catus*), leões (*Panthera leo*), leopardos (*Panthera pardus*), tigres (*Panthera tigris*), pumas (*Felis concolor*), jaguares (*Panthera onca*), chitas (*Acinonix jubatus*), linceas (*Lynx rufus*) e hiena malhada (*Crocuta crocuta*) (TROYER *et al.*, 2005).

As análises filogenéticas do FIV evidenciaram clados monofiléticos do vírus nas diferentes espécies de felídeos nas quais o vírus foi detectado; desta forma, cada uma das espécies possui um FIV bem adaptado à dita espécie (Figura 1) (PECON-SLATTERY; *et al.*, 2008). O FIV em gatos domésticos está filogeneticamente relacionado ao FIV de pumas, o qual permite concluir que o FIV pode cruzar a barreira entre espécies, no entanto, estes eventos parecem ser raros (TROYER *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2012).

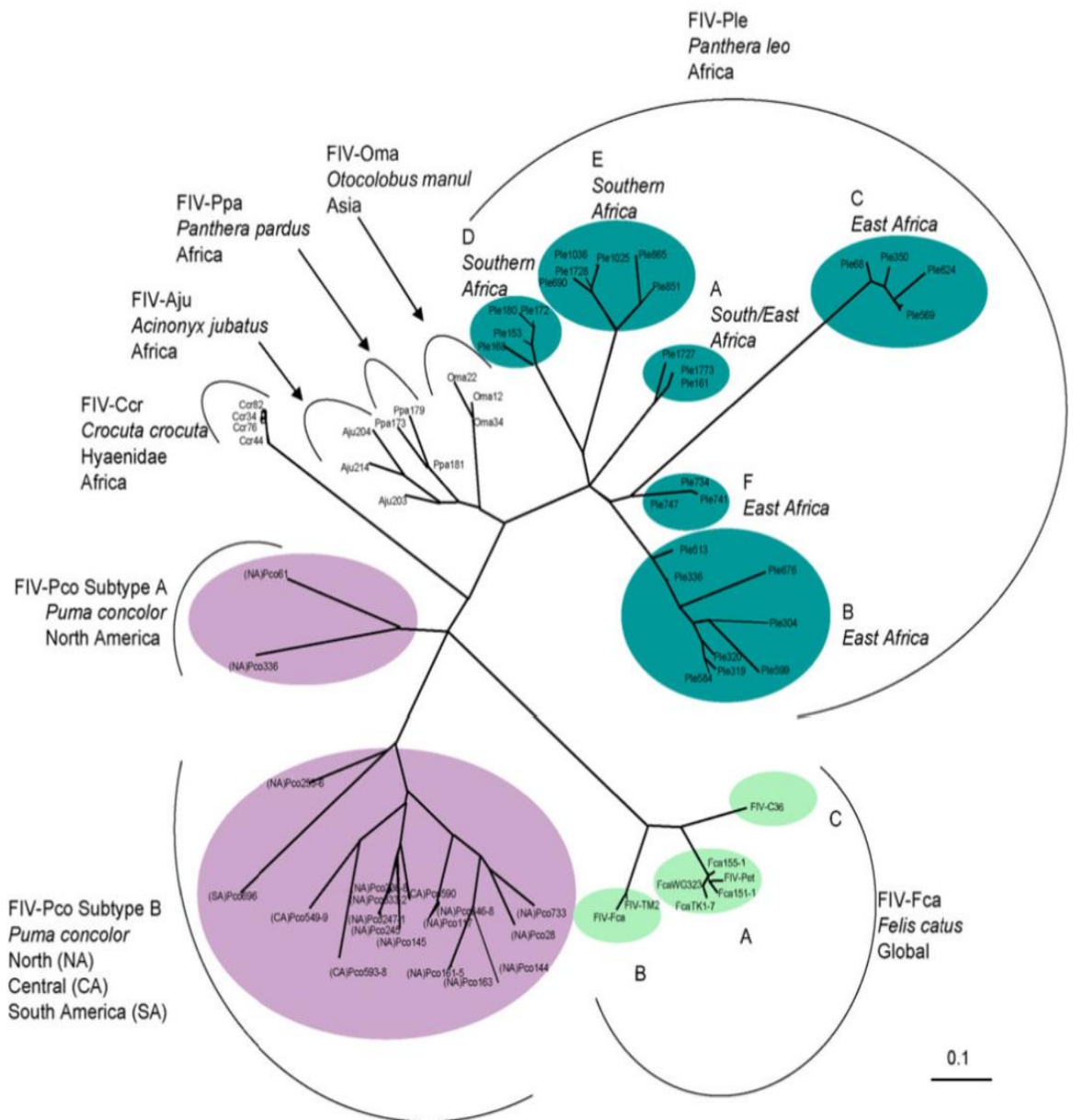


Figura 1. Árvore filogenética de FIV em diferentes espécies da família *Felidae* e *Hyaenidae* baseado no gene *pol*. Setenta e dois FIV de sete espécies de carnívoros baseado na região da RT do gene *pol*. As elipses em cor indicam os subtipos dentro dos FIV-Ple (*Panthera leo*), FIV-Pco (*Puma concolor*), FIV-Fca (*Felis catus*).

Fonte: Pecon-Slattery (2008).

A prevalência do vírus em gatos domésticos é variável e depende da localização geográfica e características da população felina, tais como sexo, idade e comportamento. Os países com maiores prevalências da infecção são aqueles com maior prevalência são aqueles com alta densidade populacional de gatos, como China, França, Rússia, Reino Unido, Itália, Japão, Turquia (Tabela 1) (GLEICH; KRIEGER; HARTMANN, 2009).

Tabela 1 - Prevalência do FIV em gatos domésticos em diferentes países

País	Método utilizado	Condição dos gatos	N	% FIV+	Referência
Estados Unidos	ELISA	Errantes	1876	3.5	(LEE <i>et al.</i> , 2002)
	ELISA e SANAP® IDEXX	Ferais	553	5.2	(LURIA <i>et al.</i> , 2004)
China	ELISA	Aleatórios	18038	2.5	(LEVY <i>et al.</i> , 2006)
	SNAP® IDEXX	Errantes, domésticos	362	9.12	(CONG <i>et al.</i> , 2016)
Rússia	ELISA	Domésticos	58	10.3	(PAVLOVA; KIRILYUK; NAIDENKO, 2015)
França	ELISA	Aleatórios	340	19.6	(COURCHAMP <i>et al.</i> , 1998)
Alemanha	ELISA	Sadios, doentes	6101	8.4	(FUCHS; BINZEL; LONSDORFER, 1994)
UK	ELISA	Errantes	517	10.4	(MURDEN, 2002)
Itália	ELISA	Doentes	277	24	(BANDECCHI, P <i>et al.</i> , 1992)
	ViraCHEK/FIV	Sadios	203	11.3	(BANDECCHI, P <i>et al.</i> , 2006)
Japão	Sorologia	Sadios	1358	14.1	(SOMA, 2008)
Espanha	SNAP® IDEXX	Sadios	180	8.3	(ARJONA <i>et al.</i> , 2000)
Espanha		Doentes	115	13.8	
Argentina	PCR	Sadios e doentes	30	56.6	(OLIVA <i>et al.</i> , 2000)
		Domésticos	389	10	(WINKLER; LO; FLOWER, 1999)
Austrália	ELISA e PCR	Ferais	66	9	
		Doentes	101	50	(GABOR <i>et al.</i> , 2001)
Bélgica	Sorologia	Errantes	346	11.3	(DORNY <i>et al.</i> , 2002)
Turquia	PetChek IDEXX	Aleatórios	103	22.3	(YILMAZ; ILGAZ; HARBOUR, 2000)
	PCR	Doentes	200	9.5	(OĞUZOĞLU <i>et al.</i> , 2013)
Israel	Sorologia	Doentes	37	22	(HARRUS <i>et al.</i> , 2002)
Vietnã	Sorologia	Errantes	54	22	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 2003)
Taiwan	Sorologia	-	32	21.9	(UEMA <i>et al.</i> , 1999)

N = número total de gatos (*Felis catus*) no estudo. Gatos feraiis: sem proprietário, selvagens, habitam áreas rurais. Gatos errantes: sem proprietário, habitam áreas urbanas, com acesso livre à rua (HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007). Gatos Sadios: sem sinais de doença clínica. Gatos doentes: animais com sinais clínicos.

Adaptado de Gleich; Krieger; Hartmann., (2009).

No Brasil, estudos de prevalência foram realizados em Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul altas prevalências foram detectadas em populações de gatos doentes com suspeita de FIV. Por outro lado, a análise aleatória de gatos domésticos identificou baixa prevalência de FIV nos estados de São Paulo e Minas Gerais (TEIXEIRA *et al.*, 2012) (Tabela 2).

Os fatores de risco para a infecção pelo vírus incluem: animais machos (cuja prevalência é de duas a três vezes maior do que em fêmeas) adultos maiores de 6 anos e animais com acesso livre à rua (LEVY *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 1989). O vírus está presente em todos os fluidos corporais, entretanto se encontra de maneira ainda mais abundante na saliva e no sangue. A transmissão horizontal por mordidas ou exposição de feridas ao sangue contaminado é a principal forma de contágio (LEVY *et al.*, 2006;

MATTEUCCI *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1988). A transmissão ocorre mais frequentemente a partir de animais recentemente infectados, coincidindo com o período de viremia (HOSIE; BEATTY, 2007).

Tabela 2—Prevalência do FIV em gatos domésticos nos estados do Brasil estudados.

Estado do Brasil	Condição dos gatos	N	% de FIV+	Referência
São Paulo	Sadios	300	7.3	(LARA; TANIWAKI.; ARAUJO JÚNIOR, 2008)
	Doentes	154	29.2	
	Domésticos	234	23.1	
	Abrigos	220	5.9	
Rio Grande do Sul	Suspeita de FIV	40	37.5	(CALDAS <i>et al.</i> , 2000)
Rio de Janeiro	Sadios, doentes	126	18.24	(SOUZA; TEIXEIRA.; GRAÇA, 2002)
Minas Gerais	Doentes, sadios	450	2.7	(CAXITO <i>et al.</i> , 2006a)
Minas Gerais	Domésticos	145	4.14	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2007)
Distrito Federal	Domésticos	200	2	(MARÇOLA <i>et al.</i> , 2013)

N = número total de gatos no estudo. Gatos sadios: sem sinais de doença clínica. Gatos doentes: animais com sinais clínicos. Abrigos: animais pertencentes a um abrigo. Modificado de Teixeira *et al.* (2012)

A transmissão horizontal por via sexual foi demonstrada experimentalmente por inseminação artificial, resultando na infecção em 3 de 6 gatas a partir de sêmen fresco de gatos machos SPF soropositivos para FIV (JORDAN, H. L. *et al.*, 1996). Partículas virais infecciosas *in vitro* foram encontradas em sêmen de gatos infectados (JORDAN, H. L. *et al.*, 1998). No entanto, a importância da transmissão sexual na epidemiologia da doença ainda é desconhecida.

Experimentalmente, a transmissão intravenosa, intramuscular e intrarectal foi também demonstrada (MOENCH *et al.*, 1993). Já a transmissão vertical se dá por infecção pré-natal (transplacentária), perinatal (durante o parto), e/ou pós-natal (consumo de leite e colostro) (ALLISON; HOOVER, 2003a, 2003b).

2.1.3 Patogênese e curso da infecção pelo FIV

A infecção pelo FIV causa uma síndrome de imunodeficiência adquirida similar à causada pelo HIV em humanos. A infecção apresenta-se normalmente em três fases: aguda, assintomática e terminal (Figura 2). Estas fases podem ser observadas experimentalmente, embora em pacientes naturalmente infectados nem sempre todas as etapas sejam evidentes. Os sinais mais observados nos animais naturalmente infectados

estão seguidamente relacionados com infecções oportunistas, doenças neurológicas e neoplasias (HARTMANN, 2012).

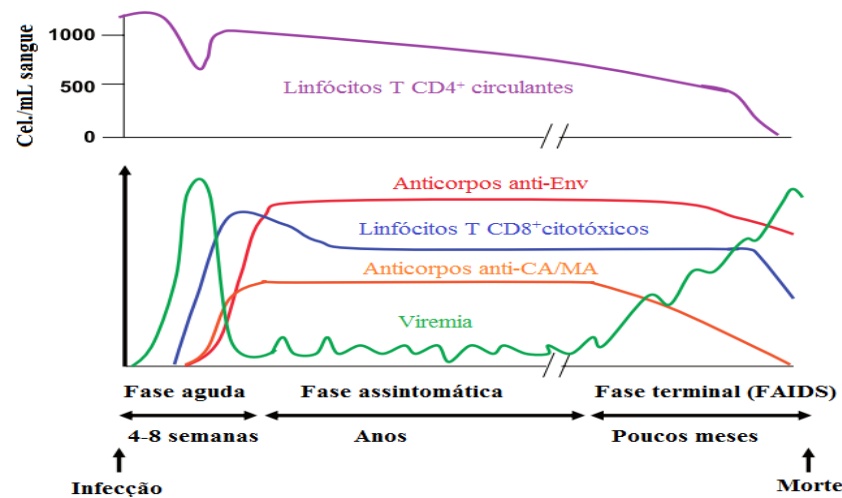


Figura 2. Esquema ilustrativo do curso da infecção pelo HIV. Na fase aguda da infecção acontece uma diminuição abrupta na contagem de LT CD4⁺ concomitante com uma viremia elevada. Posteriormente na fase assintomática o número de LT CD4⁺ é reestabelecido. Ao longo dos anos observa-se uma diminuição progressiva dos linfócitos T CD4⁺ e uma vigorosa resposta imune celular que controla a replicação viral. Na fase terminal, a resposta está caracterizada por uma exaustão imune, com queda na contagem de LT CD4⁺, LT CD8⁺, e no nível de anticorpos.

Adaptado de Lecollinet; Richardson (2008), Weiss (1993).

Na fase aguda, com duração de 4 a 8 semanas, a replicação no início da infecção acontece em células dendríticas, macrófagos e LT CD4⁺. Assim, a viremia é detectada na segunda semana pós-infecção (p.i.) e o pico é observado entre a oitava e décima segunda semana, levando à disseminação do vírus no organismo (HARTMANN, 1998; HOSIE *et al.*, 2009; LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013). Após a segunda semana p.i., os linfócitos citotóxicos T CD8⁺ específicos podem ser detectados antes da soroconversão (TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013). Os anticorpos anti-TM (transmembrana), CA (capsídeo) e MA (matriz) são detectados entre a segunda e a oitava semana (HOSIE, *et al.*, 2009; LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013). Durante a fase inicial da infecção, os animais manifestam sintomatologia leve e transitória, tais como: febre, linfadenopatia generalizada, letargia, enterite e gengivite/estomatite, dermatite, conjuntivite, doença do trato respiratório e perda de peso. Esse período é caracterizado por uma carga viral elevada e neutropenia (HARTMANN, 2012).

A resposta imune celular e humoral desenvolvida não é suficiente para eliminar o vírus do organismo, mas reduz a carga viral plasmática, marcando o início da fase

assintomática (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; TANIWAKI, FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013) Esta etapa pode durar vários anos dependendo da patogenicidade da cepa, exposição a patógenos secundários, idade do animal no momento da infecção. No entanto, a diminuição gradual das células CD4⁺ e a inversão na relação CD4⁺:CD8⁺ levam ao desenvolvimento paulatino da imunodeficiência (HARTMANN, 1998; HOSIE, *et al.*, 2009; LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013).

A fase terminal caracteriza-se pela síndrome da imunodeficiência felina (FAIDS), que cursa com uma severa imunossupressão, diminuição dos anticorpos circulantes e aumento da carga viral. Esta etapa cursa com linfadenopatia, definhamento e infecções secundárias crônicas e pode levar ao óbito em poucos meses. Ocasionalmente ocorrem neoplasias e doença neurológica (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013) Mesmo apresentando tais condições de saúde, os animais nesta fase podem retornar a uma fase assintomática na possibilidade de tratamento e cuidado apropriado. No entanto, mais de 50% dos gatos infectados não manifestam uma imunodeficiência severa e, com cuidados apropriados, podem sobreviver vários anos (HARTMANN, 2012).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo se faz baseado na anamnese, sintomas clínicos e observação de anormalidades hematológicas. Neutropenia, trombocitopenia e anemia não regenerativa estão associadas à infecção pelo vírus. Já a presença de monocitose e linfócitos e está associada às infecções secundárias (HARTMANN, 2012). A confirmação se faz por métodos diretos como isolamento viral ou por métodos indiretos como reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA ou RNA, imunocromatografia, ELISA e *Western Blot* para detecção de anticorpos (teste *Gold Standar*) (HOSIE, M. J. *et al.*, 2009; HOSIE, M. J.; BEATTY, 2007; LEVY, J. *et al.*, 2008).

O ensaio mais usado na rotina diagnóstica é comercializado na forma de um kit. O SNAP COMBO® anticorpo FIV/antígeno FeLV (IDEXX, 2016); é um teste rápido cujas sensibilidade e especificidade são de 93.5% e 100% respectivamente. A confirmação pode ser realizada por PCR, isolamento viral e *Western Blot*. No entanto, estas técnicas são utilizadas mais frequentemente em pesquisa (HOSIE *et al.*, 2009; RAVI *et al.*, 2010).

2.1.5 Tratamento

Devido à variação dos sintomas e níveis de imunossupressão entre os animais infectados, é necessário realizar avaliação adequada e assim tratamento de acordo com a sintomatologia ou condição física do animal. Quando é identificada uma doença infecciosa bacteriana secundária, a administração de antibióticos específicos é indicada. Em algumas situações tratamento prologando ou uso de vários fármacos pode ser necessário (LAPPIN, 2014).

Atualmente a legislação brasileira não permite a prescrição de antirretrovirais pelos médicos veterinários (BRASIL, Portaria No. 344, de 12 de maio de 1998). O tratamento antirretroviral é eficaz e indicado por reduzir a carga viral e melhorar o estado clínico do animal, proporcionando assim uma melhor qualidade de vida ao paciente. Um estudo demonstrou uma melhora considerável dos sintomas de estomatite em animais tratados com antirretrovirais, o que diminuiu a sua condição anoréxica (GÓMEZ, *et al.*, 2012). No entanto, nem todos os fármacos usados em humanos podem ser usados em felinos domésticos, já que alguns podem ser altamente tóxicos para essa espécie (LAPPIN, 2014).

2.1.6 Prevenção

A prevenção está baseada em evitar a exposição de animais negativos e a disseminação do vírus a partir de animais positivos. É recomendável restringir o acesso à rua, tanto dos animais positivos quanto dos negativos. A castração reduz a possibilidade de brigas entre animais e, assim, a transmissão do vírus, já que os animais castrados são menos agressivos e itinerantes do que os inteiros. É importante testar qualquer animal a ser introduzido em um grupo e, em casos de abrigo, manter os animais positivos separados dos negativos (LAPINN, 2014; CORNELL FELINE HEALTH CENTER, 2014).

Uma vacina está disponível (Fel-O-Vax®, Boehringer Ingelheim), embora não no Brasil. A vacina tem uma eficácia de 68%, sendo seu uso questionado (YAMAMOTO; PU; SATO, 2007). A vacina contém vírus inativados dos subtipos virais A e D, no entanto um estudo mostrou uma reação protetora contra o B (PU *et al.*, 2005; HOSIE; BEATTY, 2007).

2.2 Biologia molecular do vírus da imunodeficiência felina

2.2.1 Classificação, caracterização molecular e estrutural

O FIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (INTERNATION COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES; 2016.) O gênero *Lentivirus* causa infecções em humanos (HIV), bovinos (vírus da imunodeficiência bovina- BIV), ovinos e caprinos (vírus da encefalite e artrite caprina - CAEV), primatas (vírus da imunodeficiência dos símios - SIV), equinos (vírus da anemia infecciosa dos equinos – EIAV) e felinos (vírus da imunodeficiência felina - FIV) (STOYE *et al*, 2012).

O genoma viral é composto de duas fitas de RNA lineares de polaridade positiva não complementares protegidas pelo nucleocapsídeo (NC). O capsídeo protege as proteínas e o genoma viral, este por sua vez se encontra protegido pela proteína da matriz (MA) e finalmente pelo envelope viral, o qual contém as glicoproteínas de envelope de transmembrana (TM) e de superfície (SU). A partícula viral contém ainda as enzimas transcriptase reversa (RT), a integrase (IN) e a protease (PR), necessárias para o processo replicativo (Figura 3) (STOYE *et al*, 2012).

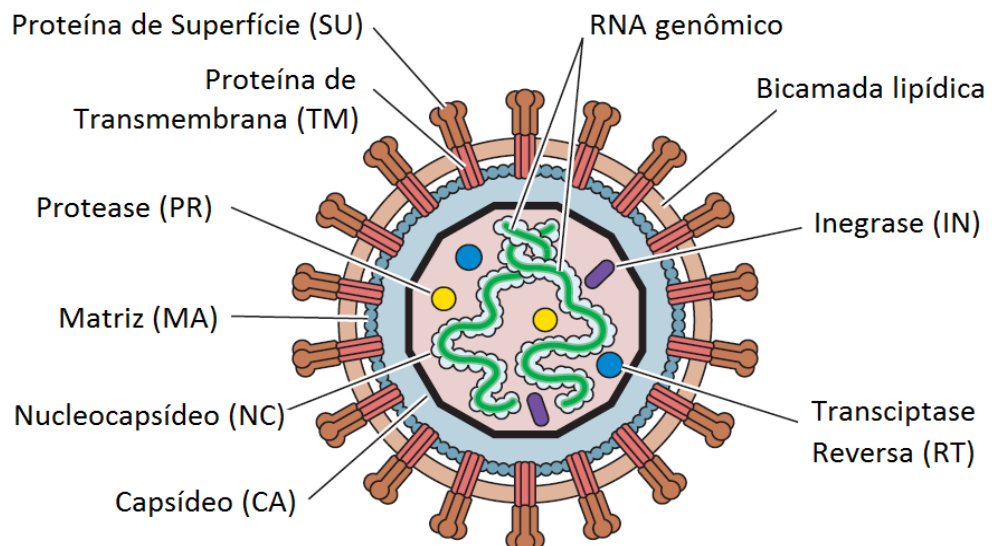


Figura 3. Estrutura do virion HIV (modelo de estudo dos retrovírus). O envelope viral conformado pela bicamada lipídica e as proteínas estruturais de superfície (SU) e transmembrana (TM). No interior, proteínas estruturais de matriz (MA) e do capsídeo (CA), duas fitas de RNA não complementares cobertas pelas proteínas do nucleocapsídeo (NC). Proteínas não estruturais: protease (PR), integrase (IN) e transcriptase reversa (RT). Adaptado de: Flint *et al.*, 2015

As fitas de RNA são poliadeniladas (poli A) na extremidade 3', possuem uma estrutura m7 GTPcap na 5' e estão associadas por complementariedade a uma molécula de RNA transportador (tRNA) na região *primer binding site* (PBS). Duas regiões curtas de sequências repetidas (R) se localizam à jusante região cap e à montante da região poli A respectivamente (DELVIKS-FRANKENBERRY *et al.*, 2011; FLINT *et al.*, 2015; HU; HUGHES, 2012).

Regiões únicas, conhecidas como U5 e U3, se localizam a jusante e a montante das regiões R da extremidade 5' e 3', respectivamente. Em seguida se encontra a região PBS, seguida pela sequência de empacotamento "*Packaging Signal ψ*" (psi,) e juntas se encontram à jusante da U5. As regiões *leader* e codificante se localizam entre as regiões únicas. Uma região rica em purinas "*polypurine tract*" (PPT) está localizada no final da região genômica à montante da U3 (STOYE *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2015).



Figura 4. Organização genômica do vírus da imunodeficiência felina. Organização genômica em sentido 5'-3': C (Cap), R (região repetida), U5 (região única 5'), PBS (tRNA *primer binding site*), ψ (sequência de empacotamento *psi*), genes *gag*, *pol*, *vif*, *OrfA*, *rev* e *env*. PPT (*polypurinetract*), U3 (região única 3'), R (região repetida), cauda poli A.

Adaptado de: Zielonka (2011).

Os retrovírus codificam três genes principais: *env*, *gag* e *pol*. O gene *env* (*envelope*) codifica duas glicoproteínas de envelope: superfície e transmembrana (SU e TM respectivamente) que estão presentes na membrana da célula infectada, e nos vírions (AFFRANCHINO; GONZÁLEZ, 2014; LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; PANCINO *et al.*, 1993). O gene *gag* (*group antigens*) codifica para precursores proteicos que são clivados por proteases virais para produzir as proteínas estruturais de matriz, capsídeo e nucleocapsídeo (MA, CA e NC, respectivamente). O gene *pol* (*polymerase*) codifica as proteínas não estruturais necessárias para a replicação e montagem do vírus: protease, ribonuclease H/transcriptase reversa, integrase e desoxiuridinatrifosfatase (PR, RH/RT, IN e dUTPase) (FLINT *et al.*, 2015).

Três genes acessórios estão presentes no genoma do FIV e são responsáveis por codificar proteínas com importantes funções na expressão gênica, infectividade e replicação viral, estas são: *vif* (*viral infectivity factor*), *orfA* e *rev* (STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013; TROYER *et al.*, 2013) (Figura 4).

2.2.2 Mecanismo intracelular de replicação

A família *Retroviridae*, agrupa vírus RNA com duas características replicativas únicas: a transcrição reversa de uma fita simples de RNA (ssRNA) em uma fita dupla de DNA (dsDNA) e sua integração no DNA cromossomal do hospedeiro (STOYE *et al.*, 2012). Uma característica importante dos retrovírus é sua variabilidade que se deve, em parte, ao processo de transcrição reversa. Neste processo são inseridas e acumuladas mutações pontuais a cada novo ciclo de replicação como resultado da baixa fidelidade da RT aliada à ausência de atividade de *proof-reading* (correção de erros) (PRESTON; DOUGHERTY, 1996). As mutações também podem ser causadas pela atividade de fatores antivirais do hospedeiro como a proteína APOBEC3 (CHIU; GREENE, 2006). A replicação se divide em infecção e entrada, desnudamento, transcrição reversa, integração do provírus, síntese de proteínas, montagem e brotamento (Figura 5).

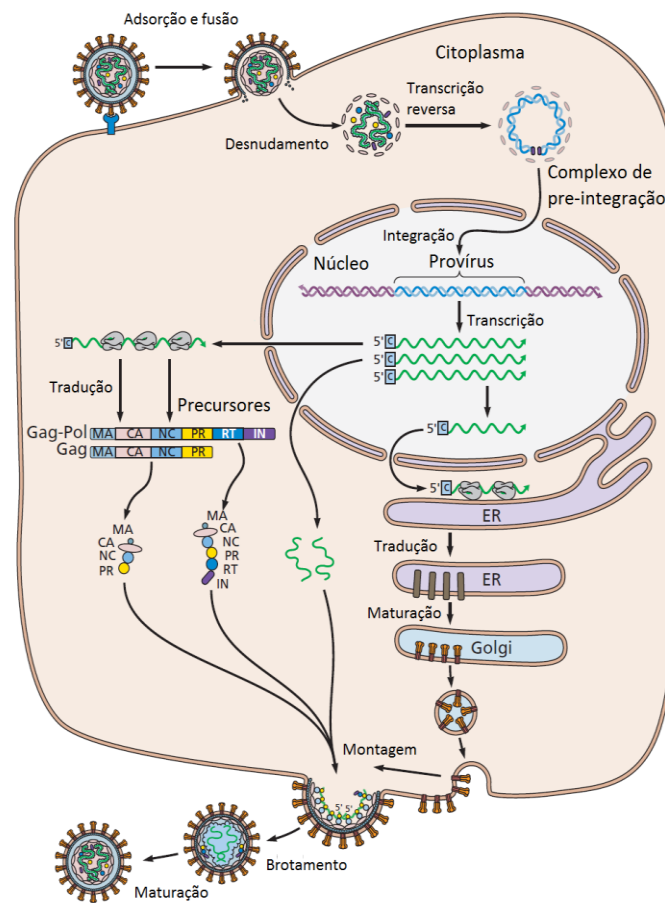


Figura 5. Ciclo replicativo dos retrovírus.
Adaptado de: Flint, et al., (2015).

O início da replicação inicia quando o FIV entra em contato com células CD134⁺. Principalmente com LT CD4⁺, no entanto, a replicação também acontece em células dendríticas, e macrófagos (TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO, 2013). Durante esse processo a glicoproteína SU do vírus entra em contato com uma região de ligação do receptor (RBS ou *receptor binding site*) do receptor CD134. Isto gera uma mudança conformacional na glicoproteína viral que permite a interação dela com o co-receptor celular (CXCR4) e, conseqüentemente, a fusão do envelope viral com a membrana celular (PASERVAL, 2004) (Figura 6). O vírion é internalizado e desnudado, liberando o genoma viral no citoplasma (FLINT *et al.*, 2015).

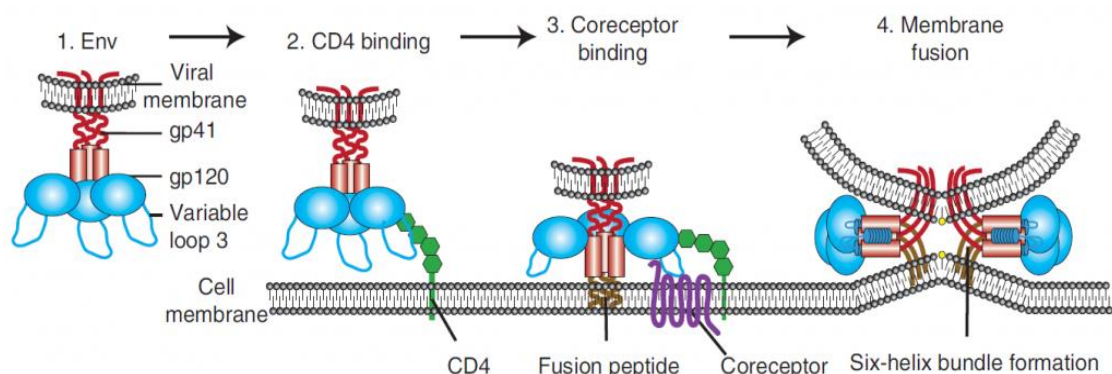


Figura 6. Processo de fusão de membranas entre o HIV (modelo de estudo de retrovírus) e célula. Para o HIV o receptor é o CD4. N
Fonte: <http://questiongene.com/researching-hiv>

A seguir tem início a transcrição reversa por ação da RT (Figura 7). Neste processo, um DNA dupla fita ou provírus, é sintetizado a partir do RNA genômico viral. A enzima RT possui atividade de DNA polimerase e pode utilizar tanto um molde de DNA quanto de RNA. A RT também tem atividade RNase H, que degrada o RNA unicamente quando se encontra hibridizado com DNA. Inicialmente, a RT sintetiza um DNA complementar (cDNA), que é fita simples negativa (ssDNA-), utilizando como iniciador um RNAt celular ligado por complementaridade na região PBS do genoma viral. O primeiro cDNA sintetizado corresponde às regiões U5 e R na extremidade 5', região conhecida como *Strong Stop DNA*. Sendo uma dupla RNA/DNA; a atividade RNase H degrada o RNA hibridizado e expõe o cDNA recém-formado (HU; HUGHES, 2012).

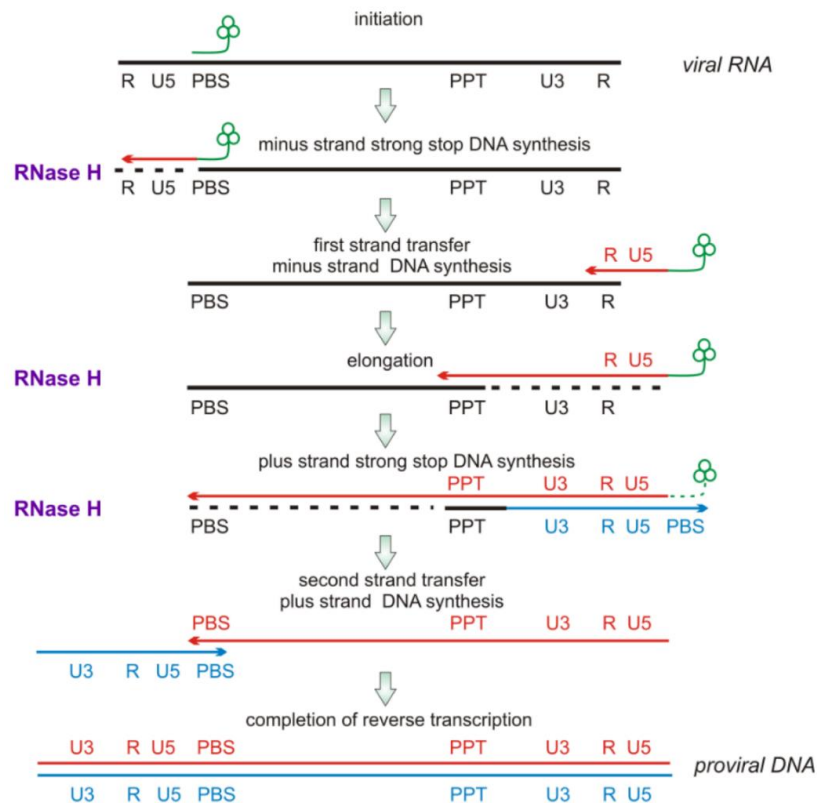


Figura 7. Etapas da transcrição reversa. A atividade RNase H da RT está indicada por “RNaseH”, a linha pontilhada indica a hidrólise do RNA. Fonte: Iliina (2012)

Devido às regiões R serem idênticas nas extremidades 5' e 3', o cDNA na região R da extremidade 5' hibridiza por complementariedade na região R da extremidade 3', mecanismo conhecido como primeira transferência da RT. Após esta transferência, a síntese do cDNA continua ao longo do genoma, junto com a degradação do RNA molde correspondente. No entanto, a região PPT é resistente a esta degradação, e em consequência serve como iniciador para a síntese da fita positiva de DNA (ssDNA+). Nessa etapa a RT copia também os primeiros nucleotídeos do tRNA, sendo substrato da RNase H. À medida em que a síntese do cDNA se aproxima da extremidade 5', a região PBS é copiada. A extremidade 3' do ssDNA+ contém também uma região PBS produto do molde de tRNA. Estas duas hibridizam por complementariedade (segunda transferência da RT) e a síntese de DNA estende-se nas duas fitas cDNA (ssDNA-) e ssDNA+ (HU; HUGHES, 2012).

O processo de transcrição reversa gera um DNA proviral maior do que o RNA viral, uma vez que as duas extremidades do DNA viral contêm sequências tanto da

extremidade 3' quanto da 5' do RNA (U3, R, U5). Estas regiões que flanqueiam o provírus são conhecidas como regiões terminais longas (LTR ou *Long Terminal Repeats*) e são indispensáveis no processo da integração ao genoma do hospedeiro. A integração é mediada pela enzima integrase (IN), a qual se associa com o DNA viral e com nucleoproteínas para ser transportado ao núcleo como um complexo denominado complexo de pré-integração (HU; HUGHES, 2012).

A integração acontece em duas etapas, a primeira é o processamento em 3', quando são removidos dois nucleotídeos na extremidade 3' do DNA viral em uma região CA (citosina-adenina) altamente conservada. A segunda etapa é conhecida como transferência da fita de DNA, na qual o DNA cromossomal é clivado e o DNA viral é inserido no lugar da clivagem (CRAIGIE; BUSHMAN, 2012).

Uma vez integrado, o genoma proviral é replicado junto com o DNA do hospedeiro durante os ciclos de divisão celular. Esse provírus é um molde para a transcrição do RNA viral, que irá gerar tanto o RNA genômico, quanto o RNA mensageiro (mRNA). Parte desses mRNA serão traduzidos nos precursores poliprotéicos *gag* e *gag-pol*. Outra parte deles será processada no núcleo para formar o mRNA da poliproteína do envelope (Env). Esta última será traduzida pelos ribossomos presentes no retículo endoplásmico. As proteínas são transportadas pelo aparelho de Golgi, onde são glicosiladas e clivadas por enzimas celulares para formar finalmente o complexo maduro TM-SU que será inserido na membrana celular. Os componentes do vírion (as duas fitas de RNA, os precursores poliprotéicos *gag* e *gag-pol*, e as proteínas TM-SU) são montados no interior da célula para serem liberados por brotamento. A protease viral PR, cliva os precursores poliprotéicos para produzir proteínas maduras e finalmente formar a partícula viral infecciosa (FLINT *et al.*, 2015).

2.2.3 Proteína de envelope (Env) e subtipos virais

A proteína do envelope tem uma função indispensável na replicação viral por permitir a adsorção aos receptores e co-receptores celulares durante a primeira etapa do ciclo replicativo (AFFRANCHINO; GONZÁLEZ, 2014). A proteína Env é composta por 865 aminoácidos e estruturalmente está constituída por trímeros conectados por ligações não covalentes das subunidades de superfície (SU) e de transmembrana (TM) (Figura 8). Estas duas subunidades são produto de uma clivagem pós-tradução do precursor proteico da Env de 130kDa, que por sua vez se origina pela remoção do peptídeo líder de uma proteína de

150kDa inicialmente sintetizada (CHECKLEY; LUTTGE; FREED, 2011; GARG; FULLER; TOMPKINS, 2004; SODORA *et al.*, 1994).

Um alto grau de variabilidade entre as sequências genômicas é observado no gene *env*. A proteína possui nove regiões hipervariáveis (Figura 8 e 9): as duas primeiras V1-V2 localizam-se na região líder e não estão presentes na proteína madura. As regiões V3-V6 se encontram na proteína de superfície (SU) e as regiões V7-V9 na de transmembrana (TM) (ELDER *et al.*, 2008; LECOLLINET; RICHARDSON, 2008; PANCINO *et al.*, 1993; SODORA *et al.*, 1994).

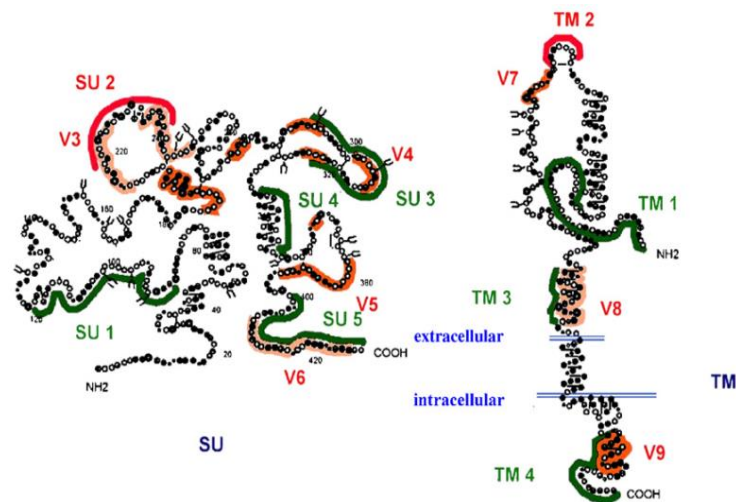


Figura 8. Representação bidimensional das proteínas do envelope do HIV com suas respectivas regiões hipervariáveis. Quatro presentes na SU (V3-V6), três presentes na TM (V7-V9).

Fonte Lecollinet S.; Richardson J., 2008.

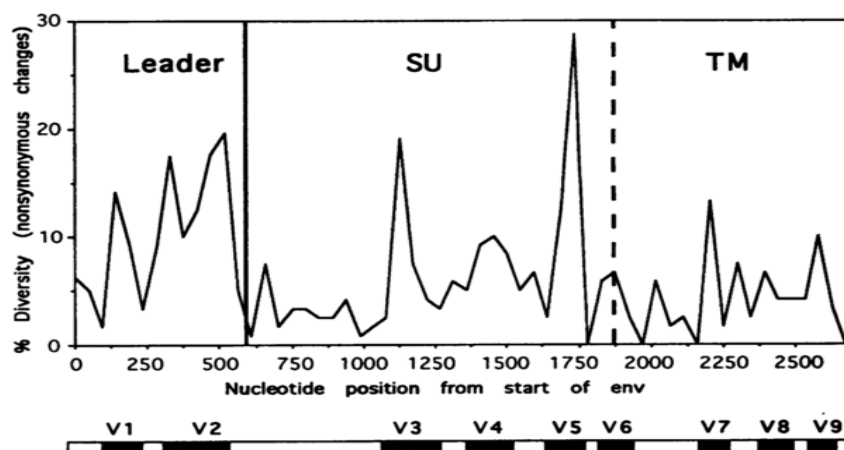


Figura 9. Regiões variáveis da proteína do envelope. Na parte superior, observa-se a porcentagem de variabilidade de 9 sequências em um alinhamento baseado em mutações não sinônimas.

Fonte Sodorat *et al.*, 1994.

Por outro lado, a proteína do envelope está submetida a uma grande pressão de seleção por constituir-se na camada mais externa do vírion e pelo fato de possuir epítomos importantes. Tais epítomos são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, e sua variabilidade propicia uma elevada taxa evolutiva para o gene. Para isso contribuem também os eventos de recombinação, conferindo ao vírus um mecanismo de evasão imune importante. Em virtude disto, durante o curso da infecção viral existe uma interação complexa entre mutação, replicação e seleção; a elevada variabilidade aumenta a possibilidade do vírus se manter na natureza. Isso ocorre porque uma parte da população viral escapa à pressão seletiva pela dificuldade de montar uma resposta eficiente e duradoura à infecção (DELVIKS-FRANKENBERRY *et al.*, 2011; HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2010; PANCINO *et al.*, 1993; PRESTON; DOUGHERTY, 1996; STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013).

As recombinações acontecem mais frequentemente no gene *env* (HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2010) e com elevada frequência quando existe uma superinfecção mesmo com subtipos idênticos sendo, neste caso, eventos de difícil documentação. Durante a transcrição reversa acontecem dois eventos obrigatórios em que a RT se separa do molde para se ligar de novo em outro lugar do RNA (Figura 7) isto pode facilitar a troca de molécula molde de RNA. Além disso, a troca de molde também pode estar sendo influenciada pelas atividades da polimerase e RNase H da RT, pois durante a síntese do DNA este fica exposto ao mesmo tempo que o RNA molde está sendo degradado do híbrido DNA:RNA. Esse processo facilita a troca de molécula molde de RNA pela RT (COFFIN, 1979; HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2010; HWANG; SVAROVSKAIA; PATHAK, 2001). Contrariamente ao *env*, os genes *gag* e *pol* são mais conservados e alterações nucleotídicas nestes genes poderiam causar comprometimento da função destas enzimas, trazendo consequências deletérias para o vírus (GREENE *et al.*, 1993; STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013).

Até hoje foram descritos sete subtipos para FIV (Figura 10). Os subtipos foram estabelecidos com base em análises filogenéticas da região V3-V5 do *env* (HAYWARD; RODRIGO, 2010; KAKINUMA *et al.*, 1995; PECORARO *et al.*, 1996; SODORA *et al.*, 1994) e *gag*.(DUARTE, A. *et al.*, 2002; HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008, 2010; KAKINUMA *et al.*, 1995; REGGETI; BIENZLE, 2004; STEINRIGL; KLEIN, 2003). O gene *pol* também foi utilizado em alguns estudos (CARPENTER, Margaret A *et al.*, 1998; HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008).

Os subtipos mais disseminados geograficamente são o A, B e C (HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008). O subtipo B já foi identificado nos Estados Unidos, Canadá, Argentina, Japão, Itália, Austrália, Alemanha (KANN *et al.*, 2006; PECORARO *et al.*, 1996; REGGETI; BIENZLE, 2004; STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013; WEAVER, 2010). No Brasil, as amostras de FIV até o presente identificadas pertencem ao subtipo B (nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Distrito Federal) (CAXITO *et al.*, 2006; MARÇOLA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2010).

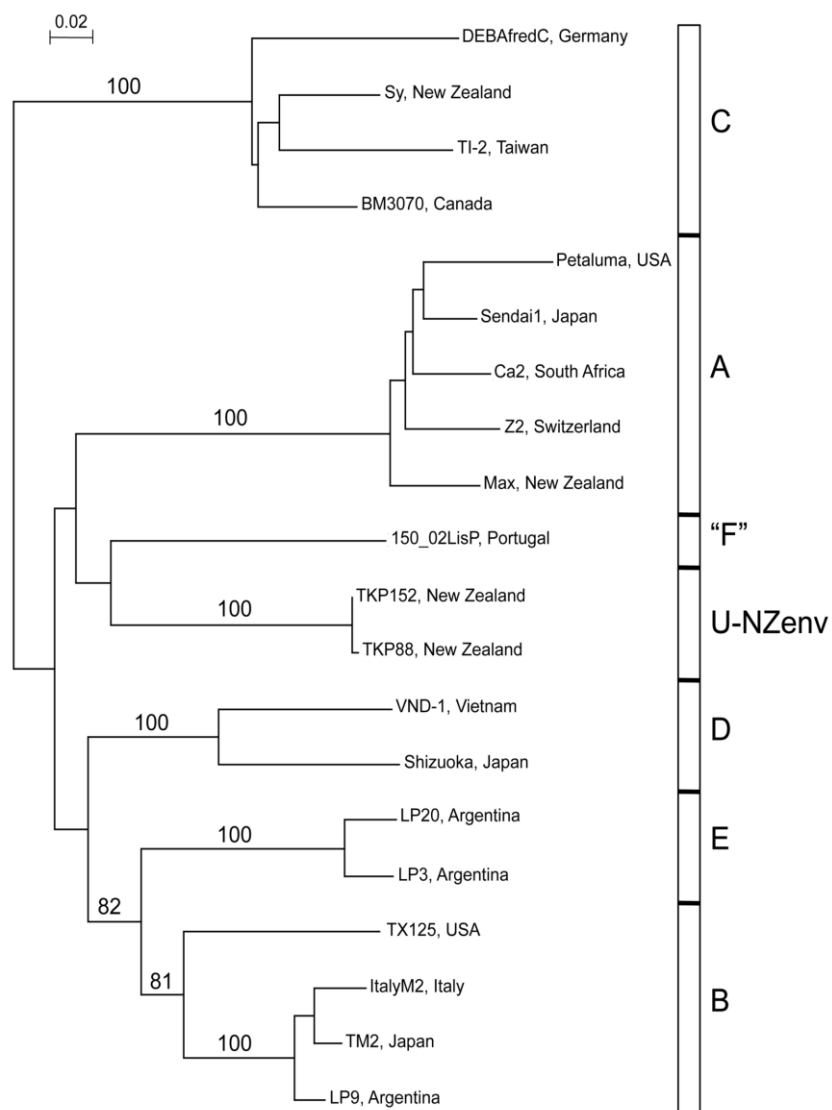


Figura 10. Árvore filogenética de algumas sequências de V3-V5 do gene *env* do FIV, indicando os subtipos e o país de procedência.

Fonte: Hayward, Rodrigo (2010).

Já o subtipo D foi detectado unicamente no Japão, Vietnã e Tailândia (KAKINUMA *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 2003). Na Argentina foi reportada a ocorrência do subtipo E (PECORARO, M. R. *et al.*, 1996). A classificação do subtipo F não está clara; inicialmente foi descrito no Texas, Estados Unidos, (WEAVER *et al.*, 2004) mas em 2006 foi reclassificado como um subclado do subtipo B e outras sequências de origem portuguesa foram classificadas como subtipo F (DUARTE *et al.*, 2006). Por último, sequências da Nova Zelândia foram identificadas como um subtipo novo “desconhecido”: U-NZenv (HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008; HAYWARD; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G., 2007). No entanto, os subtipos U-NZenv e o novo subtipo F de Portugal estão relacionados como grupos irmãos na hipótese filogenética segundo Hayward e Rodrigo (HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008).

Outras formas recombinantes em *env* têm sido descritas no Canadá (A/B), Japão (A/B, B/D), Nova Zelândia (A/C), e nos Estados Unidos (A/B, A/C, A/B/C) (BACHMANN *et al.*, 1997; CARPENTER, *et al.*, 1998; HAYWARD; RODRIGO, 2008, 2010; REGGETI; BIENZLE, 2004). Recombinantes baseados no gene *gag* foram encontrados no Canadá (A/B, A/C) e Nova Zelândia (A/C) (HAYWARD; RODRIGO, A. G., 2008, 2010; REGGETI; BIENZLE, 2004).

2.2.4 Fator de infectividade viral (Vif)

A proteína Vif é uma proteína acessória presente em todos os lentivirus, com exceção do EIAV (ROSE *et al.*, 2004; TOMONAGAT; MIKAMI, T., 1996). A proteína Vif do FIV é formada por 252 aminoácidos e as sequências de Vif são altamente conservadas em muitas linhagens de gatos domésticos e não domésticos (GU *et al.*, 2016; TOMONAGAT; MIKAMI, 1996).

A função da proteína Vif é a de contra-atacar a atividade do fator de restrição APOBEC3 (A3), impedindo a encapsidação dela nos virions nascentes (ROSE *et al.*, 2004; TROYER *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2008). Sua descoberta foi feita em 1987, quando foi demonstrado que o HIV com o gene *vif* deletado (HIV- Δ Vif) tem uma capacidade infectiva 1000 vezes menor do que o vírus selvagem (STREBEL *et al.*, 1987). Esta proteína é indispensável para a replicação viral *in vivo* e em células não permissivas (neste caso, que expressam a A3), já que é incorporada no vírion por uma interação com o RNA viral. Na célula infectada, a Vif induz a poliubiquitinação das A3, causando sua

degradação pelo proteossomo (HENRIET *et al.*, 2009; MARIN *et al.*, 2003; SHEEHY *et al.*, 2002).

2.3 Fatores de restrição

Além da resposta imune humoral e celular contra retrovírus, outros fatores proteicos de defesa já foram descritos. Em vertebrados as células conferem fatores e vias celulares que são usados pelos vírus na replicação. No entanto, em paralelo, tais células também expressam diversas proteínas com função de “restringir” passos da replicação viral. Este comportamento faz parte de uma resposta inicial de defesa contra a infecção, precedendo inclusive a resposta imune inata que se denomina “imunidade intrínseca” (POESCHLA, 2011; YAN; CHEN, 2013).

Os fatores de restrição são um grupo de proteínas expressas constitutivamente nas células, cuja função é de modular a infectividade, replicação e montagem de vírions. Além disso, podem determinar a gama de hospedeiros do vírus, atuando como uma barreira na transmissão viral entre espécies. Os mais estudados são a *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3* (APOBEC3 ou A3), a teterina, *Tripartite motif-containing protein 5* (TRIM5 α), a helicase *Moloney Leukaemia Virus 10* (MOV10) e *SAM domain and HD domain-containing protein 1* (SAMHD1) (MALIM; BIENIASZ, 2012; ZHENG; JEANG; TOKUNAGA, 2012).

2.3.1 APOBEC3 (A3)

As proteínas A3 pertencem à superfamília de proteínas com função citidina e deoxicitidinadeaminases, a qual também inclui: deaminase induzida por ativação (AID), APOBEC1, 2 e 4 (A1, A2 e A4) (KOBAYASHI *et al.*, 2004; ROGOZIN *et al.*, 2005).

A descoberta das proteínas A3 ocorreu após a descoberta da proteína Vif do HIV, na tentativa de compreender o que estaria restringindo a infectividade do HIV- Δ Vif. Experimentos de fusão celular permitiram observar que o fator de restrição celular, chamado inicialmente CEM15 (APOBEC3G), era o responsável pela inibição (MALIM; BIENIASZ, 2012; SHEEHY *et al.*, 2002).

Estruturalmente, todas as proteínas APOBEC possuem dois ou três domínios de desaminação de citidina coordenados por Zinco ou domínio Z. Cada um desses domínios apresenta a sequência conservada His-Xaa-Glu-Xaa₂₃₋₂₈-Pro-Cys-Xaa₂₋₄-Cys, onde X

pode ser qualquer aminoácido (aa). O centro catalítico está formado por uma histidina (His) e duas cisteínas (Cys) que ligam o íon Zn^{+2} . Já um glutamato tem função de translocar prótons na reação hidrolítica de desaminação (HARRIS; LIDDAMENT, 2004; IMAHASHI; NAKASHIMA; IWATANI, 2012).

O mecanismo de ação da A3 consiste na edição pós-síntese de resíduos de citidina à uridina, alterando a sequência de aminoácidos no DNA proviral. A enzima converte os resíduos de deoxicitidina (dC) à deoxiuridina (dU) na fita negativa de DNA viral, ocasionando, conseqüentemente, a incorporação de deoxiadenina (dA), ao invés de uma deoxiguanina (dG), na fita complementar. A consequência é uma mutação de G para A no DNA proviral, o que é conhecido como hipermutação. O DNA proviral com hipermutações pode ser degradado ou integrado (Figura 11) (HENRIET *et al.*, 2009; PROHASKA *et al.*, 2014; TAKAORI-KONDO, 2006).

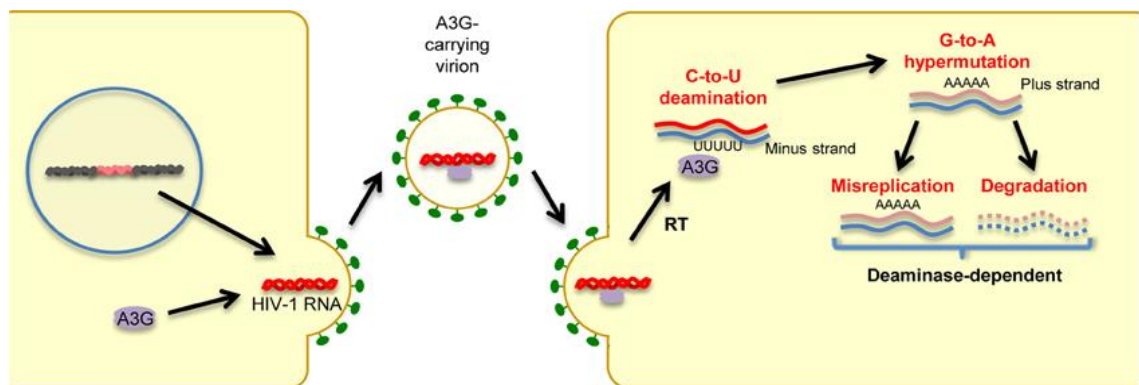


Figura 11. Mecanismo antirretroviral da proteína A3G. As proteínas restringem os vírus HIV deficientes Vif. A3G é incorporado dentro das partículas virais recentemente formadas, após da infecção de outras células, A3G inibe a replicação viral pela desaminação do DNA viral (fita negativa) no processo da transcrição reversa gerando hipermutações $G \rightarrow A$ no genoma proviral.

Fonte: Arias *et al.*, 2012

Todas as proteínas A3 contêm uma ou duas cópias de um domínio catalítico de zinco (Z1, Z2 ou Z3) de acordo com a composição de aminoácidos. As proteínas A3 podem ser classificadas de acordo com o tipo destes domínios Z que elas contêm. Estes genes evoluíram de forma independente entre as diferentes espécies de mamíferos. Assim, os genes A3 variam em número e características entre espécies, desta forma, os humanos possuem sete genes, os equinos seis, os suínos dois, os roedores possuem um e os felinos possuem quatro (Figura 12) (JÓNSSON; ANDRÉSDÓTTIR, 2013; LARUE *et al.*, 2009).

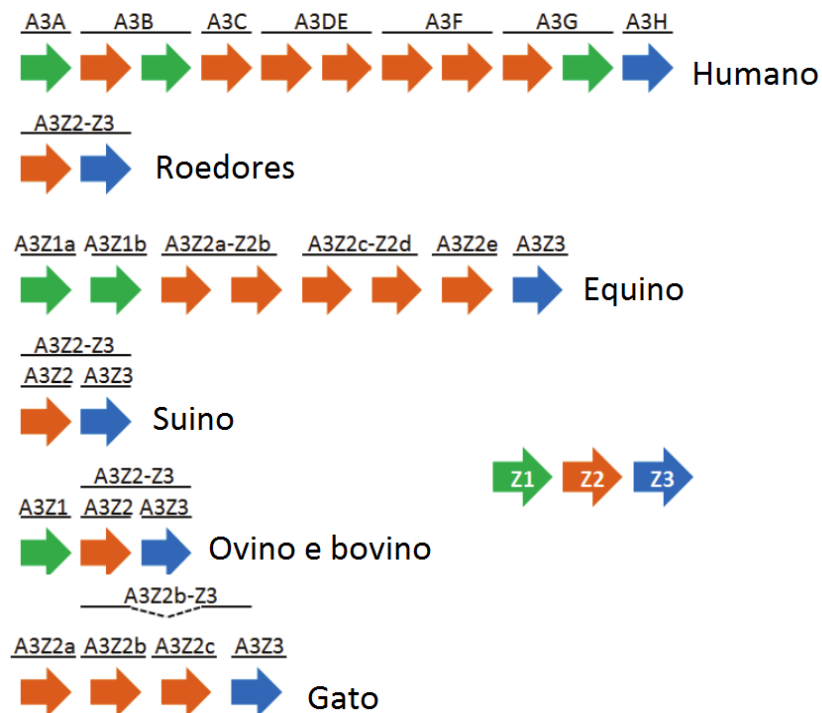


Figura 12. Representação esquemática dos genes A3 em diferentes espécies de mamíferos
 Modificado de Jónsson, Andrésdóttir (2013)

2.3.2 APOBEC3 e Vif felinos

Em felinos existem 3 genes com motivos Z2: A3Z2a, A3Z2b e A3Z2c (similares ao A3C em humanos) e um gene com motivo Z3: A3Z3 (similar ao A3H) (ZIELONKA; MÜNK, 2011). Esses genes dão origem a sete transcritos com um motivo A3Z2a, A3Z2b, A3Z2c, A3Z3 e três transcritos originados por *splicing* alternativo com dois motivos Z: A3Z2b-Z3 (com variantes A e B) e A3Z2c-3Z (Figura13) (MÜNK *et al.*, 2008). Em gatos as proteínas A3Z3 e A3Z2-Z3 possuem atividade antiviral (MÜNK *et al.*, 2008; ZHANG, *et al.*, 2016).

A grande diversidade nos genes A3, os diferentes eventos evolutivos dos mesmos, e a expressão da proteína Vif pelo FIV, são um exemplo da co-evolução vírus-hospedeiro (MÜNK; WILLEMSSEN; BRAVO, 2012).

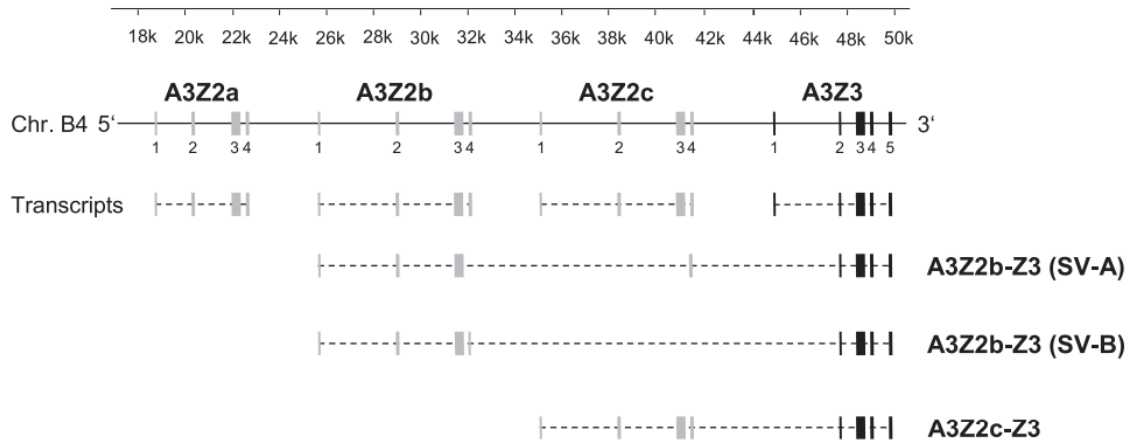


Figura 13. Representação das regiões codificantes de A3 no cromossomo B4 do genoma de *Feliscatus*. Os transcritos com os éxons traduzidos estão representados por retângulos. Em cinza os exons pertencentes ao domínio Z2 e em preto os pertencentes ao domínio Z3.
Fonte: Munk (2008).

Estudos recentes mostraram a existência de cinco polimorfismos no exon 3 do gene A3Z3 de gatos domésticos) e foi demonstrada uma correlação positiva entre um dos polimorfismos descritos (A65S) e a presença de infecção por retrovírus (CASTRO et al., 2014). Os genótipos GG e TA para o A65S evidenciaram uma correlação positiva com maior suscetibilidade à infecção, *in vitro*. Além disso, o haplótipo mais frequente (GGGGCT) foi associado com resistência à infecção (CASTRO *et al.*, 2014). Utilizando técnicas de transfecção em cultivo celular, foi observado que os sete haplótipos restringem a infectividade do FIV- Δ Vif, mas o haplótipo V de A3Z3 se mostrou resistente à degradação pela Vif do FIV (YOSHIKAWA *et al.*, 2016).

ARTIGO 1

PHYLODYNAMICS OF THE BRAZILIAN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Manuscrito que será submetido à publicação no periódico *Infection, Genetics and Evolution*

PHYLODYNAMICS OF THE BRAZILIAN FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

Authors: Lucía Cano-Ortiz^{1,§,*}, Dennis Maletich Junqueira^{2,§}, Juliana Comerlato¹, Cristina Santos Costa, André Zani¹, Naila Blatt Duda³, Raissa Nunes dos Santos¹, Fernanda Vieira Amorim da Costa⁴, Paulo Roehle¹, Ana Cláudia Franco¹.

Affiliations

¹ Virology Laboratory, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre – RS. CEP 90150-070

² Centro Universitário Ritter dos Reis - UniRitter, Health Science Department, Porto Alegre, RS, Brazil. Rua Orfanotrófio, 555, Alto Teresópolis - Porto Alegre - RS. CEP 90840-440

³ Clinical Veterinary Laboratory, Veterinary Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 - Bairro Agronomia, Porto Alegre - RS. CEP. 90540-000

⁴ Clinical Veterinary Hospital, Veterinary Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090 - Bairro Agronomia, Porto Alegre - RS. CEP. 90540-000

***Corresponding Author: Lucía Cano-Ortiz**

[§] These authors contributed equally to this work.

E-mail: lcanoo@unal.edu.co

Abstract

Feline Immunodeficiency virus (FIV), like other retroviruses, displays large genomic divergence when different isolates are compared. In this study, 31 FIV positive samples of domestic cats from Porto Alegre-RS, Brazil were used aiming at a detailed genomic characterization and a better understanding of the molecular epidemiology of the virus in Brazil. The proviral *env* genes were partially amplified, sequenced and compared with another 237 sequences from different continents. We identified several Brazilian highly supported clades (A, B1, B2, C e D) that suggest independent events of introduction of FIV in Brazil. Forty six reference-sequences from the GenBank were used with our 31 sequences to infer the virus subtypes. Our sequences belong to the subtype B and four of them result from a recombination with the previously described subtype F. The other 27 Brazilian samples belonging to subtype B and another 47 Brazilian sequences from the GenBank were used to estimate the time to the most recent common ancestor of each Brazilian clade, using a Bayesian approach and a relaxed molecular clock model. The analyses of Brazilian sequences suggests different entries of the virus in the Brazilian cat population between 1981 and 1991.

Key words:

Feline immunodeficiency virus, subtype B, recombination, molecular clock

1. Introduction

The feline immunodeficiency virus (FIV) is an important pathogen, with a worldwide distribution, responsible for the feline acquired immunodeficiency syndrome (FAIDS) in domestic cats and other members of the *Felidae* and *Hyaenidae* (Pedersen et al., 1987; Troyer et al., 2005). The clinical disease is characterized by a progressive immunosuppression and hyperactivation of the immune system (Taniwaki et al., 2013; Tompkins and Tompkins, 2008). The prevalence of FIV infections is variable in the cat population, it is estimated of 1-14% in cats without clinical signs and 50% in sick cat (Gabor et al., 2001; Hartmann, 1998; Hosie et al., 2009).

To date, seven FIV subtypes were recognized in different countries (A-F and U-NZenv), based on the partial sequences of *gag* and the V3-V5 regions of *env* genes (Bachmann et al., 1997; Greene et al., 1993; Hayward and Rodrigo, 2008; Kakinuma et al., 1995; Olmsted et al., 1992; Pecoraro et al., 1996; Pistello et al., 1997; Reggeti and Bienzle, 2004; Sodora et al., 1994; Uema et al., 1999; Weaver et al., 2004). The V3-V5 regions encode important neutralizing epitopes and are also important for the cellular tropism of the virus (Hosie et al., 2011, 2002; Teixeira et al., 2010).

Retroviral variability is due to point mutations, due to the lack of proof-reading activity of the reverse transcriptase, and recombination as a result of template-switching during reverse transcription (Bachmann et al., 1997; Carpenter et al., 1998). Recombinant strains have been reported in FIV, and the *env* gene is a frequent target for recombination (Bachmann et al., 1997; Carpenter et al., 1998; Hayward and Rodrigo, 2010, 2008; Reggeti and Bienzle, 2004).

Previous studies in Brazil showed the circulation of subtype B in São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Distrito Federal (Caxito et al., 2006a, 2006b; Martins et al., 2008; Teixeira et al., 2010, 2007). To date, previous analyses of the Brazilian samples, based on sequences of V3-V4 regions, allowed their classification as FIV-B (Caxito et al., 2006b; Martins et al., 2008; Medeiros et al., 2012; Teixeira et al., 2010). A deeper phylogenetic analysis of Brazilian samples

is important in order to understand the molecular epidemiology history of the virus in Brazil (Bachmann et al., 1997; Sodora et al., 1994; Steinrigl et al., 2010).

2. Theory

There are few studies on the epidemiology of the FIV in Brazil and only few sequences around the world available to understand the dynamic of virus infections. Our objective is to analyse FIV samples collected from infected cats in Rio Grande do Sul State and through a phylogenetic approach we aim to understand de FIV epidemiology in Brazil.

3. Methods

3.1 Samples

Peripheral blood of domestic cats was collected at the Hospital de Clínicas Veterinárias/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) between 2012 and 2016 (Figure S2). The extraction of DNA was performed using buffer-saturated phenol and the samples were stored at -20C. The inclusion criteria for the samples was positive diagnosis for FIV infection by SNAP FIV/FelV Combo Test Idexx or PCR (results not shown). Thirty-one positive samples were used for the study (Table S1). Animals were non-pedigree cats, characterized by being a genetically heterogeneous population. The informed consent was given to the owners and all the study protocols were approved by the ethic committee of the university (CEUA/UFRGS/project number 29749).

3.2 Nested PCR

FIV provirus DNA was submitted to a nested polymerase chain reaction (PCR), in which the FIV *env* region was the gene target. The first round of PCR included the primers: VIF_FIV_PF: 5'-CTTCCTGAAGGGGATGAGTG-3' and ENV_PR 5'-

CCTARTTCTTGCATAGCRAAAGC-3'. Second round of PCR was developed with ENV2-3_PF: 5'-GAATGAGACTATAACAGGAC-3' and ENV2-3_PR: 5'-CAAGACCAATTTCCAGCAAT-3'. The final PCR product length with 831pb was sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). The generated chromatograms were then assembled into contigs and visually inspected using Geneious® software (version 9.0.1).

3.3 Sequence Subtyping

In addition to the sequences generated in this study, forty-six reference-sequences of FIV subtypes A to F (Table S2) were selected from the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Final alignment (31 new sequences and 46 references) were generated using MUSCLE (Edgar, 2004).

In order to infer the sequence subtype, a Maximum Likelihood (ML) phylogeny was inferred in PhyML (Guindon et al., 2005) incorporating the best-fitted nucleotide substitution model (GTR+4I) as determined in MEGA6 (Tamura et al., 2013). The approximate likelihood-ratio test (aLRT) based on Shimodaira-Hasegawa-like procedure were used to assess confidence in topology (Anisimova and Gascuel, 2006). The maximum likelihood phylogenetic tree was draw using FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2009). Sequences presenting phylogenetic uncertainty in the subtype assignment were submitted to bootscanning analysis using Simplot 3.5.1 (Lole et al., 1999). The Kimura 2-parameter model was used as a distance model on a sliding window of 200 nt by increments of 20 nt. Only high-supported FIV subtype B (FIV-B) sequences were included in subsequent analyzes.

3.4 Brazilian FIV

All available American FIV subtype B sequences from *env* gene were downloaded from the GenBank. In addition, year of isolation, host specie and geographical information about the samples were also retrieved from the GenBank or directly from the study describing the sequence. To understand the Brazilian phylogenetic relationship with global variants, we included a random

number of sequences (chosen by phylogenetic means) of each non-American country available at the GenBank. All sequences analyzed in this study were obtained from domestic cats.

The final alignment included 237 sequences comprehending samples from Asia, Americas and Europe. After submission to MUSCLE, a Maximum Likelihood (ML) phylogeny was inferred in PhyML using the same criteria described above (Figure S1).

3.5 Dating Transmission Events

In addition to the 27 sequences (pure subtype B) generated in this study (Table S1), 47 Brazilian samples downloaded from the GenBank (Table S3) were aligned together to create a Brazilian dataset. In order to estimate the time to the most recent common ancestor (T_{mrc}) of each Brazilian clade, dated phylogenies were reconstructed using a Bayesian MCMC method implemented in BEAST v1.8.3 (Drummond and Rambaut, 2007). The Bayesian analyses assumed an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock under the GTR+I+ Γ nucleotide substitution model and non-parametric Bayesian skyline plot. Due to the low temporal signals of the datasets, the use of the evolutionary rate as normal mean prior was required (Beczowski et al., 2015). The MCMC chain were run for 3.0×10^8 chain steps on the CIPRES Science Gateway and the convergence was evaluated in TRACER v1.5 excluding an initial 10% for burn-in (Miller et al., 2011; Rambaut and Drummond, 2007). Maximum clade credibility trees (MCC) were summarized using TreeAnnotator v1.8.3 and the resulting tree was visualized with FigTree v.1.4.3. Uncertainty in parameter estimates are reflected in the 95% highest probability density (HPD) values.

4. Results

4.1 Amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted using blood samples from 31 FIV positive cats. A nested PCR was used to amplify an 831pb proviral fragment of *env* gene which spans the C4 -V4 region. Such region was sequenced and used for the phylogenetic analyses.

4.2 FIV subtype B and recombinant samples B/F

Nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database with accession numbers MF062039-MF062069. All 31 FIV samples analyzed here belonged to subtype B. However, four sequences showed a different clustering pattern (Figure 1). Such samples were further submitted to bootscan analyses on a sliding window of 200 nt by increments of 20 nt. Using reference-sequences of each subtype from the GenBank, these analyses indicate that these four samples result from recombination events between B and F FIV subtypes (Figure 2). The additional 27 samples belong to the subtype B and were subsequently used for the further analyses.

4.3 Phylogenetic analyses and Brazilian clades

In order to understand the origin of the FIV-B Brazilian epidemic, we submitted a dataset including 237 sequences belonging to subtype B (comprehending samples from South America, Asia, Americas and Europe) to ML phylogenetic inference. The resulting tree shows the existence of five main Brazilian clades (Figure S1, clades A, B1, B2, C, and D). Clade A is predominantly composed of sequences sampled in Rio de Janeiro and encompasses eight sequences from Rio Grande do Sul (all generated in this study). Clades B1, B2, C, and D are, on the other hand, mainly composed of sequences from Minas Gerais.

A Bayesian approach allowed the inference about temporal trends of the FIV-B in the Brazilian cat population (Figure 3). Seventy-four FIV-B sequences from Brazil were aligned together and submitted to BEAST v1.8.3. The median estimated evolutionary rate for the *env* region was 1.3×10^{-3} subst/site per year; similar to that previously estimated for FIV (Beczowski et al., 2015). The dense sampling of Brazilian sequences and the consistent formation of clades,

suggest several different entries of FIV in the cat population between 1981 and 1991 (1929-1996) (Figure 3).

Discussion

Feline immunodeficiency is an important viral disease in cat population worldwide. In South America the prevalence and the molecular epidemiology of the virus has not been well evaluated and the studies are sparse (Teixeira et al., 2012). In Brazil just a few molecular epidemiology studies have been performed and to date all Brazilian samples belong to subtype B (Caxito et al., 2006a, 2006b; Martins et al., 2008; Teixeira et al., 2010, 2007).

In this study, only FIV positive samples, tested previously by PCR and/or by the SNAP Combo FeLV Ag/FIV Antibody Test (IDEXX), were used. Thirty-one samples of FIV positive cats were used to amplify a fragment of *env*. A nested PCR was performed to increase the sensitivity of amplification using in the first reaction a high-fidelity polymerase to amplify an approximately 3Kb long fragment. The final fragment (831bp long) includes the V3 region that is used for subtype classification. V3 is the major immunodominant region of *env* with an important epitope for the interaction with the cell co-receptor (de Parseval et al., 2006). The sequencing results revealed that all samples from this study belong to subtype B, which corroborates with previous studies performed in different regions of Brazil (Caxito et al., 2006a, 2006b; Martins et al., 2008; Teixeira et al., 2010, 2007).

In addition, as four out of the 31 samples analysed clustered together but differently from the other samples of this study, further analyses were performed in order to check the possibility of recombination between subtypes, a well-known phenomenon in retroviruses and reported in FIV strains (Hayward and Rodrigo, 2010, 2008; Negroni and Buc, 2001; Reggeti and Bienzle, 2004). Indeed, the bootscan analyses showed that these four samples (78A, 54AC, 9C and 18C)

are probably the result of recombination events between subtyped B and F (Figure 1), a subtype that was described initially in Texas, United States (Weaver et al., 2004).

This study suggests, for the first time, the occurrence of a recombinant FIV in Brazil, here a recombinant between subtypes B and F, and indicates that other recombinants might circulate in FIV infected cats in Brazil. Such results highlight the importance of molecular epidemiology studies, as the occurrence of recombinants may impact the development of the epidemic and/or severity of the disease, as well as control measures (Hayward and Rodrigo, 2010; Weaver et al., 2004). The analyses performed here clearly showed the existence of several Brazilian clades, which possibly represent different entries of the virus in the country. Such independent entries, in addition to recombination, are probably the main players of genetic diversity of FIV in Brazil.

The evolutionary rate for *env* was previously estimated in 1.16×10^{-3} , similar to the one found here. This is twice or three times higher than the estimated for *env* gene of the FIV in the cougar (Biek et al., 2003) probably because the FIV origin in domestic cats is most recent (Hayward and Rodrigo, 2010). The Brazilian subtype B has emerged between 1981 and 1991, a few years before the first reports in the country (Hagiwara et al., 1993). Nonetheless, because of the limited number of sequences available to date, a broader analysis, using more sequences obtained from different dates would be valuable to confirm the results presented here. The lack of sequences from other regions of Brazil prevented the formulation of any hypothesis about the development of FIV epidemics in other regions of the country.

Minimize the risk factors in order to avoid the virus dissemination is required. Strategies of sterilization and restriction of the free access of the cats to the street are important. Moreover, the knowledge of the circulating strains by molecular studies are important in order to implement adequate vaccination programs (Levy et al., 2008). The epidemiology of the infectious disease in animals, are influenced by human practices and currently the globalization and the increase of cat owners may enable the movement of the animals and viruses. In conclusion, the results presented here shows for the first time the recombinant strains B/F and the dating of the FIV-B in the world and in Brazil, bringing light to the knowledge on molecular epidemiology of FIV infections in

Brazil elsewhere. However, these are preliminary results which can be boosted with a larger number of samples from different regions of the country.

Founding

Source of Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo para Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55, 539–52. doi:10.1080/10635150600755453
- Bachmann, M.H., Mathiason-Dubard, C., Learn, G.H., Rodrigo, A.G., Sodora, D.L., Mazzetti, P., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1997. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *Journal of Virology* 71, 4241–53.
- Beczowski, P.M., Hughes, J., Biek, R., Litster, A., Willett, B.J., Hosie, M.J., 2015. Rapid evolution of the env gene leader sequence in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology* 96, 893–903. doi:10.1099/vir.0.000035
- Biek, R., Rodrigo, A.G., Holley, D., Drummond, A., Anderson, C.R., Ross, H.A., Poss, M., 2003. Epidemiology, Genetic Diversity, and Evolution of Endemic Feline Immunodeficiency Virus in a Population of Wild Cougars. *Journal of Virology* 77, 9578–9589. doi:10.1128/JVI.77.17.9578
- Carpenter, M.A., Brown, E.W., Macdonald, D.W., Brien, S.J.O., 1998. Phylogeographic Patterns of Feline Immunodeficiency Virus Genetic Diversity in the Domestic Cat. *Virology* 251, 234–243. doi:10.1006/viro.1998.9402
- Caxito, F.A., Coelho, F.M., Oliveira, M.E., Resende, M., 2006a. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from State of Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58, 1222–1225. doi:10.1590/S0102-09352006000600035
- Caxito, F.A., Coelho, F.M., Oliveira, M.E., Resende, M., 2006b. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary research communications* 30, 953–956. doi:10.1007/s11259-006-3363-8
- de Parseval, A., Grant, C.K., Sastry, K.J., Elder, J.H., 2006. Sequential CD134-CXCR4 interactions in feline immunodeficiency virus (FIV): soluble CD134 activates FIV Env for CXCR4-dependent entry and reveals a cryptic neutralization epitope. *Journal of virology* 80, 3088–3091. doi:10.1128/JVI.80.6.3088-3091.2006
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214. doi:10.1186/1471-2148-7-214
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Gabor, L., Love, D., Malik, R., Canfield, P., 2001. Feline immunodeficiency virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Australian Veterinary Journal* 79, 540–545. doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10742.x
- Greene, W., Meers, J., Chdwick, B., Carnegie, P., Robinson, W., 1993. Nucleotide sequences of Australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. *Archives of Virology* 132, 369–379. doi:10.1007/BF01309546
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* 33, W557–W559.
- Hagiwara, M.K., Reche Junior, A., Lucas, S.R.R., Dagli, M.L.Z., 1993. Feline

- immunodeficiency virus infection in cats from São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 30, 217–220. doi:10.1590/S0103-84782008000800024
- Hartmann, K., 1998. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *The Veterinary Journal* 155, 123–137. doi:10.1016/S1090-0233(98)80008-7
- Hayward, J.J., Rodrigo, A.G., 2010. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134, 68–74. doi:10.1016/j.vetimm.2009.10.011
- Hayward, J.J., Rodrigo, A.G., 2008. Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. *Virology journal* 5, 76. doi:10.1186/1743-422X-5-76
- Hosie, M.J., Addie, D., Bélak, S., Boucraut-Baralon, C., 2009. Feline Immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 575–584. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.006
- Hosie, M.J., Pajek, D., Samman, A., Willett, B.J., 2011. Feline immunodeficiency virus (FIV) neutralization: A review. *Viruses* 3, 1870–1890. doi:10.3390/v3101870
- Hosie, M.J., Willett, B.J., Klein, D., Dunsford, T.H., Cannon, C., Shimojima, M., Neil, J.C., Jarrett, O., 2002. Evolution of Replication Efficiency following Infection with a Molecularly Cloned Feline Immunodeficiency Virus of Low Virulence. *J. Virol.* 76, 6062–6072. doi:10.1128/jvi.76.12.6062-6072.2002
- Kakinuma, S., Motokawa, K., Hohdatsu, T., Yamamoto, J.K., Koyama, H., Hashimoto, H., 1995. Nucleotide Sequence of Feline Immunodeficiency Virus: Classification of Japanese Isolates into Two Subtypes Which Are Distinct from Non-Japanese Subtypes. *Journal of virology* 69, 3639–46.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V., 2008. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10, 300–316. doi:10.1016/j.jfms.2008.03.002
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology* 73, 152–60.
- Martins, A.N., Medeiros, S.O., Simonetti, J.P., Schatzmayr, H.G., Tanuri, A., Brindeiro, R.M., 2008. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology* 82, 7863–74. doi:10.1128/JVI.00310-08
- Medeiros, S. de O., Martins, A.N., Dias, C.G.A., Tanuri, A., Brindeiro, R. de M., 2012. Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. *Virology Journal* 9, 99. doi:10.1186/1743-422X-9-99
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2011. The CIPRES science gateway: A Community Resource for Phylogenetic Analyses. *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference on Extreme Digital Discovery - TG '11* 1–8. doi:10.1145/2016741.2016785
- Negrone, M., Buc, H., 2001. Mechanisms of Retroviral Recombination. *Annual Review of Genetics* 275–302. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090551
- Olmsted, R.A., Langley, R., Roelke, M.E., Goeken, R.M., Adger-Johnson, D., Goff, J.P., Albert, J.P., Packer, C., Laurenson, M.K., Caro, T.M., 1992. Worldwide prevalence of

- lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. *Journal of Virology* 66, 6008–18.
- Pecoraro, M.R., Tomonaga, K., Miyazawa, T., Kawaguchi, Y., Sugita, S., Tohya, Y., Kai, C., Etcheverrigaray, M.E., Mikami, T., 1996. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology* 77, 2031–2035. doi:10.1099/0022-1317-77-9-2031
- Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L., Yamamoto, J.K., 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235, 790–793. doi:10.1126/science.3643650
- Pistello, M., Cammarota, G., Nicoletti, E., Matteucci, D., Curcio, M., Del Mauro, D., Bendinelli, M., 1997. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. *Journal of General Virology* 78, 2247–2257. doi:10.1099/0022-1317-78-9-2247
- Rambaut, A., 2009. FigTree v1.4: Tree Figure Drawing Tool.
- Rambaut, A., Drummond, A., 2007. Tracer v1.6.
- Reggeti, F., Bienzle, D., 2004. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *Journal of General Virology* 85, 1843–1852. doi:10.1099/vir.0.19743-0
- Sodora, D.L., Shpaer, E.G., Kitchell, B.E., Dow, S.W., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1994. 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* 68, 2230–8.
- Steinrigl, A., Ertl, R., Langbein, I., Klein, D., 2010. Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134, 82–89. doi:10.1016/j.vetimm.2009.10.013
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197
- Taniwaki, S.A., Figueiredo, A.S., Araujo, J.P., 2013. Virus-host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 36, 549–557. doi:10.1016/j.cimid.2013.07.001
- Teixeira, B.M., Hagiwara, M.K., Cruz, J.C.M., Hosie, M.J., 2012. Feline immunodeficiency virus in South America. *Viruses* 4, 383–396. doi:10.3390/v4030383
- Teixeira, B.M., Logan, N., Cruz, J.C.M., Reis, J.K.P., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Hagiwara, M.K., Willett, B.J., Hosie, M.J., 2010. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology* 155, 379–384. doi:10.1007/s00705-009-0587-2
- Teixeira, B.M., Rajão, D.S., Haddad, J.P.A., Leite, R.C., Reis, J.K.P., 2007. 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* 59, 939–942. doi:10.1590/S0102-09352007000400019
- Tompkins, M., Tompkins, W., 2008. Lentivirus-induced Immune Dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 724–732. doi:10.1038/jid.2014.371

- Troyer, J.L., Pecon-slattery, J., Roelke, M.E., Johnson, W., Vandewoude, S., Vazquez-salat, N., Brown, M., Frank, L., Woodroffe, R., Winterbach, C., Winterbach, H., Hemson, G., Bush, M., Alexander, K.A., Revilla, E., Brien, S.J.O., 2005. Seroprevalence and Genomic Divergence of Circulating Strains of Feline Immunodeficiency Virus among Felidae and Hyaenidae Species. *Journal of Virology* 79, 8282–8294. doi:10.1128/JVI.79.13.8282
- Uema, M., Ikeda, Y., Miyazawa, T., Lin, J., Chen, M., Kuo, T., Kai, C., Mikami, T., Takahashi, E., 1999. Feline immunodeficiency virus subtype C is prevalent in northern part of Taiwan (Abstract). *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 197–199.
- Weaver, E.A., Collisson, E.W., Slater, M., Zhu, G., 2004. Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. *Journal of Virology* 78, 2158–63. doi:10.1128/JVI.78.4.2158

Figures

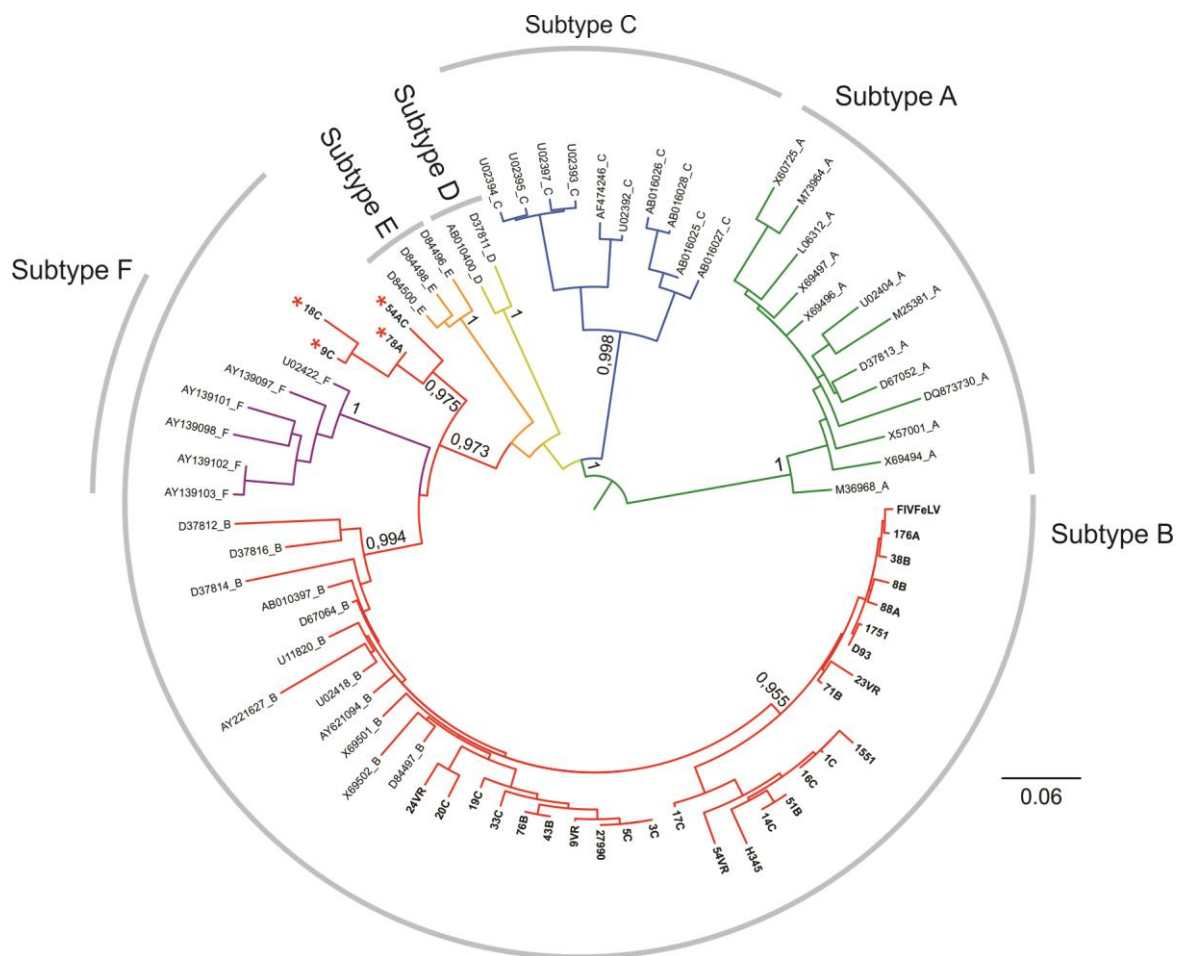


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of 77 FIV *env* sequences of six subtypes (A-F). Branches are colored according to the subtype of each sequence (indicated by gray lines). Bolded tips mark the sequences generated in this study. The * indicates recombinant sequences (Figure 2). aLRT value is indicated only at key nodes. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site.

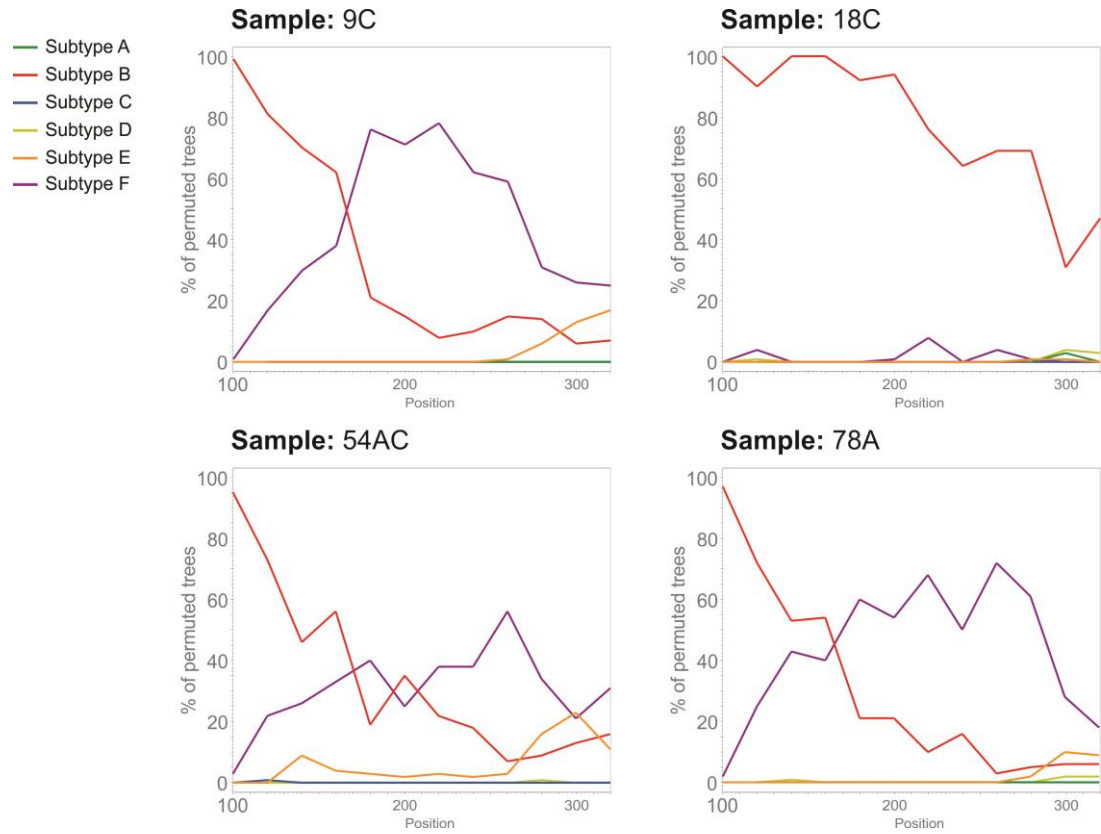


Figure 2. Bootscanning plots of four FIV recombinant sequences sampled across Rio Grande do Sul, Brazil. Bootscan analyses were performed on a sliding window of 200 nt by increments of 20 nt. Reference samples for each FIV subtype used for these analyses were the same as those included in Figure 1 (Table S2).

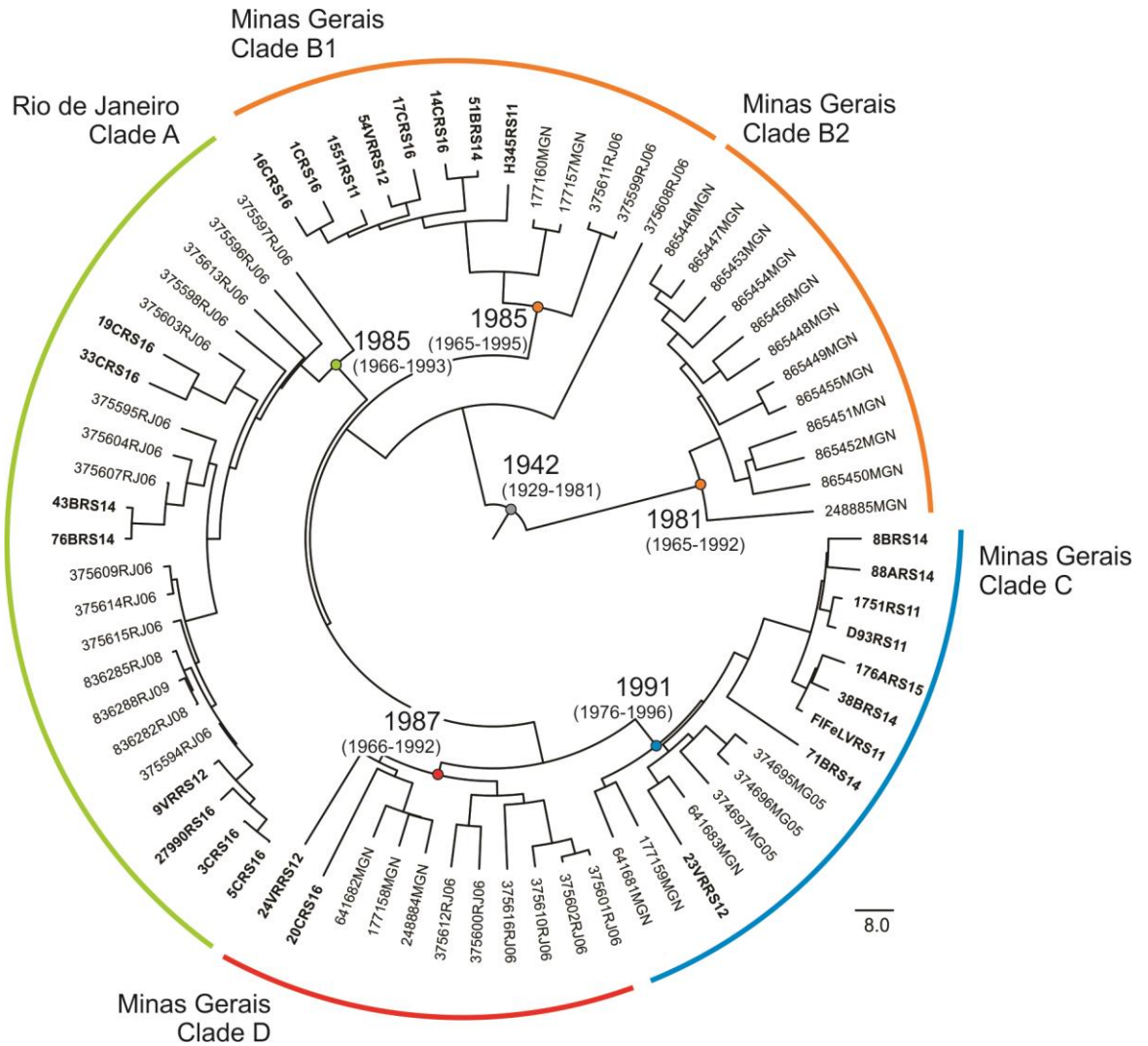


Figure 3. Bayesian phylogenetic tree of 74 FIV subtype B *env* Brazilian sequences. Positions of the five major Brazilian clades are indicated by colored semi circled lines. Bolded tips mark the sequences generated in this study. Dates on the ancestral nodes of each main group/clade indicate the time to the most recent common ancestor (95% HPD in parentheses). Key nodes with posterior probabilities higher than 0.9 are denoted by *. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site.

Supporting Information

Table S1. Identification of the domestic cats samples used in this study, in Porto Alegre-RS, Brazil, between 2012 and 2016, GenBank accession numbers, dates of collection and references of the Figure 3.

GenBank Accession Number	Sample	Year of collection	Fig. 3 reference
MF062039	54AC	2012	54ACRS12
MF062040	78A	2014	78ARS14
MF062041	88A	2014	88ARS14
MF062042	176A	2015	176ARS15
MF062043	8B	2014	8BRS14
MF062044	38B	2014	38BRS14
MF062045	43B	2014	43BRS14
MF062046	51B	2014	51BRS14
MF062047	71B	2014	71BRS14
MF062048	76B	2014	76BRS14
MF062049	1C	2016	1CRS16
MF062050	3C	2016	3CRS16
MF062051	5C	2016	5CRS16
MF062052	9C	2016	9CRS16
MF062053	14C	2016	14CRS16
MF062054	16C	2016	16CRS16
MF062055	17C	2016	17CRS16
MF062056	18C	2016	18CRS16
MF062057	33C	2016	33CRS16
MF062058	27990	2016	27990RS16
MF062059	1551	2011	1551CRS11
MF062060	1751	2011	1751RS11
MF062061	D93	2011	D93RS11
MF062062	FIVFeLV	2011	FIFELVRS11
MF062063	H345	2011	H345RS11
MF062064	9VR	2012	9VRRS12
MF062065	19C	2016	19CRS16
MF062066	20C	2016	20CRS16
MF062067	23VR	2012	23VRRS12
MF062068	24VR	2012	24VRRS12
MF062069	54VR	2012	54VRRS12

Table S2. Sequences used in this study, accession number, country of origin and subtype.

GenBank Accession Number	Country	Subtype
D37813	Japan	A
D67052	Japan	A
DQ873730	South Africa	A
L06312	France	A
M25381	United States	A
M36968	United States	A
M73964	United States	A
U02404	North America	A
X57001	Switzerland	A
X60725	Netherland	A
X69494	United Kingdom	A
X69496	United Kingdom	A
X69497	United Kingdom	A
AB010397	Japan	B
AY221627	Canada	B
AY621094	United States	B
D37812	Japan	B
D37814	Japan	B
D37816	Japan	B
D67064	Japan	B
D84497	Japan	B
U02418	United States	B
U11820	United States	B
X69501	Italy	B
X69502	Italy	B
AB016025	Taiwan	C
AB016026	Taiwan	C
AB016027	Taiwan	C
AB016028	Taiwan	C
AF474246	Canada	C
U02392	North America	C
U02393	North America	C
U02394	North America	C
U02395	North America	C
U02397	North America	C
AB010400	Japan	D
D37811	Japan	D
D84496	Argentina	E

D84498	Argentine	E
D84500	Argentine	E
AY139097	United States	F
AY139098	United States	F
AY139101	United States	F
AY139102	United States	F
AY139103	United States	F
U02422	North America	F

Table S3. Sequences of Brazilian FIV of domestic cats, accession number and state of origin used for the analyses.

GenBank Accession Number	State of Isolation
DQ177157	Minas Gerais
DQ177158	Minas Gerais
DQ177159	Minas Gerais
DQ177160	Minas Gerais
DQ248884	Minas Gerais
DQ248885	Minas Gerais
DQ641681	Minas Gerais
DQ641682	Minas Gerais
DQ641683	Minas Gerais
DQ865446	Minas Gerais
DQ865447	Minas Gerais
DQ865448	Minas Gerais
DQ865449	Minas Gerais
DQ865450	Minas Gerais
DQ865451	Minas Gerais
DQ865452	Minas Gerais
DQ865453	Minas Gerais
DQ865454	Minas Gerais
DQ865455	Minas Gerais
DQ865456	Minas Gerais
FJ374695	Minas Gerais
FJ374696	Minas Gerais
FJ374697	Minas Gerais
EU375594	Rio de Janeiro
EU375595	Rio de Janeiro
EU375596	Rio de Janeiro
EU375597	Rio de Janeiro
EU375598	Rio de Janeiro
EU375599	Rio de Janeiro
EU375600	Rio de Janeiro
EU375601	Rio de Janeiro
EU375602	Rio de Janeiro
EU375603	Rio de Janeiro
EU375604	Rio de Janeiro
EU375607	Rio de Janeiro
EU375608	Rio de Janeiro
EU375609	Rio de Janeiro
EU375610	Rio de Janeiro
EU375611	Rio de Janeiro
EU375612	Rio de Janeiro

EU375613	Rio de Janeiro
EU375614	Rio de Janeiro
EU375615	Rio de Janeiro
EU375616	Rio de Janeiro
JN836282	Rio de Janeiro
JN836285	Rio de Janeiro
JN836288	Rio de Janeiro

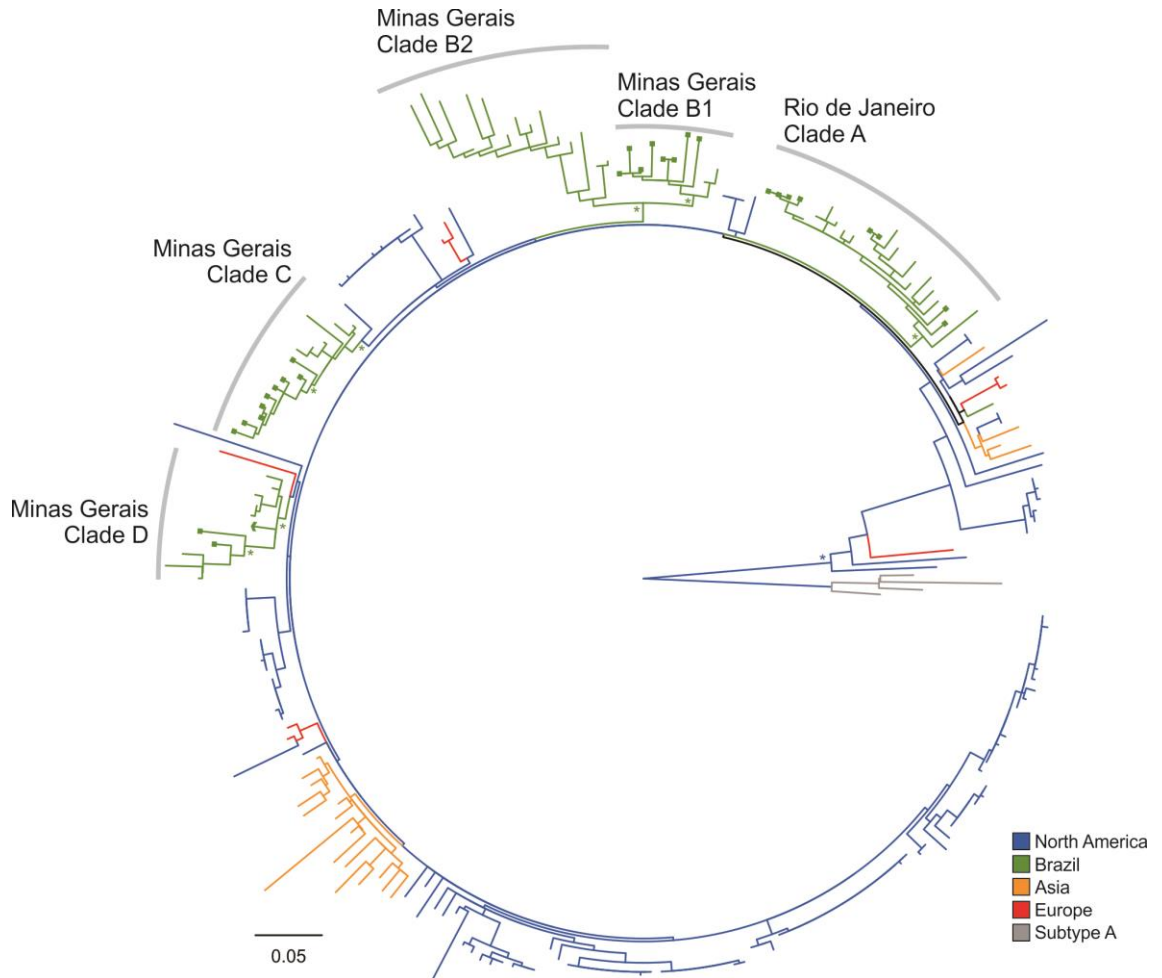


Figure S1. Maximum likelihood phylogenetic tree of 237 FIV subtype B *env* sequences from around the world. Branches are colored according to the geographic origin of each sequence as indicated at the legend (bottom right). Positions of the five major Brazilian clades are indicated by gray lines. Tips marked with a green square represent sequences generated in this study. The tip indicated by a green arrow shows the only Argentinean sequence (the only non-Brazilian South American sequence). The * indicates key nodes with an aLRT support value greater than 0.85. Tree were rooted using FIV subtype A reference sequences. The branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site.

ARTIGO 2

**ABSENCE OF A3Z3 RELATED HYPERMUTATIONS IN THE *ENV* AND *VIF*
PROVIRAL GENES IN FIV NATURALLY INFECTED CATS**

Authors: LUCIA Cano-Ortiz^{1*}, DENNIS Maletich Junqueira², CRISTINA Santos Costa, ANDRÉ Zani¹, PAULO Roehé¹, ANA CLÁUDIA Franco¹.

Affiliations

¹Virology Laboratory, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, CEP 90150-070

² Centro Universitário Ritter dos Reis - UniRitter, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

***Corresponding Author: Lucía Cano-Ortiz**

E-mail: lcanoo@unal.edu.co

1. Abstract

We studied the correlation between the APOBEC A3Z3 haplotypes in domestic cat and the frequency of hypermutations in the FIV *vif* and *env* genes. The genes *vif*, *env* and exon 3 from A3Z3 were amplified and sequenced from naturally infected cats in Porto Alegre-RS, Brazil. The sequences show a low or undetectable level of hypermutations and could not be associated to a specific haplotype.

2. Introduction

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a *Lentivirus* of the *Retroviridae* family able to infect several species of the *Felidae*. However, it is only reported to cause the feline acquired immunodeficiency syndrome (FAIDS) in the domestic cat (*Felis catus*) (PECON-SLATTERY; MCCRACKEN; *et al.*, 2008). Besides its biological and genomic similarity with HIV which make it valuable as a natural model for the study of AIDS (TROYER, R. M. *et al.*, 2013), FIV has a large veterinary importance due to its high prevalence in domestic cats worldwide (BANDECCHI, P *et al.*, 2006; EV *et al.*, 1994; ISHIDA *et al.*, 1989; LEVY, J. K. *et al.*, 2006; RAVI *et al.*, 2010). Similar to other retroviruses, one of the steps of FIV replication cycle is the reverse transcription of the genome; the reverse transcriptase enzyme uses the viral RNA as a template for the provirus synthesis, which will be further integrated in the genome of the host cell. The proviral DNA is flanked by LTRs and is constituted of structural genes (*gag*, *pol* and *env*) and accessory, auxiliary and regulatory genes (*vif*, *orfA* and *rev*, respectively) (KENYON; LEVER, 2011; MIYAZAWA, T *et al.*, 1994). The viral infectivity factor (Vif) is a 23-29 kDa protein essential to the formation of infectious viral particles in non-permissive cells (GABUZDA *et al.*, 1992; SOVA; VOLSKY, 1993; TOMONAGAT; MIKAMI, T., 1996).

Mammalian cells express restriction factors that play an important antiretroviral role in innate immunity. One of them is apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (APOBEC3, A3), which belongs to DNA cytidine deaminases family (HARRIS; LIDDAMENT, 2004). Cats encode four APOBEC3 proteins (A3Z2a, A3Z2b, A3Z2c e A3Z3). In addition, a fifth protein named A3Z2Z3, is expressed by read-through alternative splicing (MÜNK *et al.*, 2008). The A3 proteins expressed in infected cells are encapsulated in the virions and act in the cytoplasm of the target cell, after RNA liberation (CEN *et al.*, 2004; LUO, K. *et al.*, 2004). During the reverse transcription of the viral genome, A3 catalyzes the deamination reaction by converting cytidines into uridines, thus inducing G-to-A hypermutations in the newly-synthesized viral DNA (MANGEAT *et al.*, 2003; WEDEKIND *et al.*, 2003; ZHANG, H. *et al.*, 2003). As a viral counter measure, A3 activity is drastically diminished as it is tagged for proteosomal degradation by Vif, coded by the virus (CONTICELLO; HARRIS; NEUBERGER, 2003; YU, Xianghui *et al.*, 2003).

The interaction among Vif, A3 and a ubiquitin ligase complex leads to its polyubiquitination and degradation (JÄGER *et al.*, 2013; MALIM; BIENIASZ, 2012). Vif contains different N-terminal motifs that interact with A3Z2 and A3Z3. Moreover, it is able to interact through the residues 50-80, outside the interaction sites (GU; ZHANG, Z.; CANO; *et al.*, 2016). Importantly, alterations in the coding sequence of A3 may modify the stability, subcellular localization and, consequently, its interaction with Vif. Seven haplotypes of A3Z3 encoded by domestic cats have been reported (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014). Among them only haplotype V has demonstrated resistance *in vitro* to FIV Vif-mediated degradation, determined by the lateral chain of the amino acid on position 65 (YOSHIKAWA *et al.*, 2016).

The objective of this study was to evaluate the effect of different A3Z3 haplotypes on the frequency of nucleotide (nt) changes in the *env* and *vif* sequences of FIV positive animals, for this, thirty one samples of peripheral blood of domestic cats from Porto Alegre, RS, Brazil were collected between 2012 and 2016 in the Hospital de Clínicas Veterinárias/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The DNA extraction was performed using buffer-saturated phenol and the DNA was stored at -20° C. All samples were positive for FIV infection by SNAP FIV/FeLV Combo Test Idexx or PCR (results not shown). Twenty-nine FIV positive samples were used for the study. Animals were non-pedigree cats, characterized by being a genetically homogeneous population. The informed consent was given by the owners and all the study protocols were approved by the ethic committee of the University (CEUA/UFRGS/project number 29749).

The exon 3 of A3Z3 gene (APOBEC3) was submitted to a PCR with the following primers: A3H2F and A3H3R (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014). FIV provirus was amplified by a nested PCR. The first round of amplification was performed with the primers VIF_FIV_PF, generating a 3.1kb long fragment using the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA). In order to amplify part of the *env* gene, a second round of amplification was made with ENV2-3_PF and ENV2-3_PR, the final product was of 831pb. In order to amplify the *vif* gene, the same product of 3.1 kb was submitted to another second round of amplification with primers VIF_FIV_PF and VIF_FIV_PR, generating a 756pb long fragment that encompassed the entire *vif* gene (Table S1). In order to sequence the entire *vif* gene, this product was cloned into pCR2.1 vector using TOPO TA Cloning kit (Thermo Fisher Scientific). Final PCR products of A3Z3 (590pb), *env*(831pb) and the cloned fragment of *vif* was sequenced using BigDye

Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). The generated chromatograms were then assembled into contigs and visually inspected using Geneious® software.

The sequences of the 590pb (A3Z3) were analysed for the haplotypes by MLOCUS(LONG; WILLIAMS; URBANEK, 1995). The *env* and *vif* sequences of were submitted to Hypermut 2.0 to identify G→A hypermutations. Hypermut is available from <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>. All the *env* sequences belong to FIV subtype B (data not shown). The *env* and *vif* sequences were compared respectively with the D37812 and LC79040 sequences available in the GenBank.

From all 31 samples used in this study, A3Z3 exon 3 was successfully amplified from 30 samples and *env* was amplified from 27 samples. All clones of each *vif* version were identical, confirming their nucleotide sequence (data not shown), finally the complete *vif* sequences was obtained from 14 different samples.

According to previous studies, the polymorphisms in the exon 3 of feline A3Z3 gene are as follows: A65S (A65I), R68Q, A94T and V96I (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014). In the present study we found five of the seven described haplotypes among the 30 samples using MLOCUS program (LONG; WILLIAMS; URBANEK, 1995). The frequency of each genotype found in the present study is shown in Table 1. The occurrence of such haplotypes was evidenced in both chromosomes of the sampled animals, totalizing 60 haplotypes. Haplotype GGGG was predominantly found (30 times, see Table 2). The genotype and allele sequences were determined by the gene counting method (genotypes of samples were determined manually), and the Hardy-Weinber equilibrium was calculated.

In the present study the SNPs that resulted in a non-synonymous mutation in the codons and the SNPs that included in the exon 3 of A3Z3 gene only were considered for the analyses and haplotype definition. Polymorphisms in P100P and 134698145T>C described by Castro and colleagues (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014) and summarized by Yoshikawa and colleagues (YOSHIKAWA *et al.*, 2016), were not considered.

The frequency of A3Z3 haplotypes found here were not different from a previous study that sampled the same codificant region of A3Z3 ($p=0.6257$) (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014). However, unlike the study of Castro *et al.* we did not detect haplotypes VI and VII in our cat population most likely due to the low frequency of these variants (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014). Studies searching for polymorphism in a population with a small size of sample results in restricted analyses and limit the results. The calculated linkage disequilibrium between polymorphisms indicated that all loci segregate together (values of $D' < 0.18$).

In order to find a correlation between the A3Z3 haplotypes, the proviral sequences and a resistance to Vif-mediated degradation in *env* and *vif* genes, the sequences of *env* and the clones of *vif* were analysed with Hypermut 2.0 software, searching for G→A hypermutations. Both groups of sequences (*env* and *vif*) showed a low or undetectable level of hypermutation ($p > 0.05$) preventing the correlation of mutations and haplotypes. These results differed from what was expected since the haplotype V in cats was correlated with resistance to FIV infection (CASTRO, F. L. DE *et al.*, 2014) and showed to be resistant to Vif-mediated degradation in vitro (YOSHIKAWA *et al.*, 2016). In the present study only two samples belong to haplotype V.

However, investigations of the effect of the A3 *in vivo* are not conclusive because the number of hypermutated sequences is usually small (KNOEPFEL *et al.*, 2011). Possibly the effect of only one SNP, previously associated with susceptibility, (CASTRO,

F. L. DE *et al.*, 2014) and the *in vitro* studies of resistance of the haplotypes to Vif mediates-degradation (YOSHIKAWA *et al.*, 2016) would not enough to confirm the resistance to the infection due to the direct effect of the A3Z3 protein. Therefore, an approach about the viral genomes in the host, searching for hypermutatios, is an interesting strategy of asses the different A3Z3 proteins activity. In addition, the study of another A3Z3 regions, or other feline A3 genes may allow the establishment of a correlation with resistance or susceptibility *in vivo* to the virus and possibly with the occurrence of hypermutations in different FIV genes. In humans the effect of different SNPs in A3 have been more broadly studied and variants in A3 were associated with hypermutations in *env*, *gag* and *pol* and with the progression of the disease in HIV positive patients (COLSON *et al.*, 2014). Such effects were correlated with different restriction activity of A3 (HARARI *et al.*, 2009).

The lack of correlation between A3Z3 haplotypes and hypermutations in *env* and *vif* may be explained, at least in part, by the small number of samples analysed here. In addition, it is possible that the identification of the nucleotide sequences of the whole *env*, as performed in other studies with HIV or other genes, as *pol* and *gag*, would clarify the relation between A3Z3 and the occurrence of hypermutations in the FIV genome (COLSON *et al.*, 2014; LAND *et al.*, 2008). Remarkably, hypermutations in two HIV positive patients were correlated with the endogenization of the virus, and hypermutations in *env* and *vpu* genes. However, hypermutations in these genes were not associated with mutations in *vif* (LAND *et al.*, 2008). According with this, in the present study some polymorphism were observed in the *vif* sequences, but none of them in regions identified for interaction with A3Z3 and A3Z2 (GU; ZHANG, Z.; ORTIZ; *et al.*, 2016). The sequences of *vif* showed that all of them are functional, and do not present deleterious

mutations that could impair their function. This is evidenced to by the lack of hypermutations detected in the *env* gene.

References

- AFFRANCHINO, J. L.; GONZÁLEZ, S. A. Understanding the process of envelope glycoprotein incorporation into virions in simian and feline immunodeficiency viruses. **Viruses**, 2014. v. 6, n. 1, p. 264–283.
- ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **Aids research and human retroviruses**, 2003a. v. 19, n. 5, p. 421–434.
- _____; _____. Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. **Aids research and human retroviruses**, 2003b. v. 19, n. 3, p. 245–253.
- ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic biology**, ago. 2006. v. 55, n. 4, p. 539–52.
- ARJONA, A. *et al.* Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of clinical microbiology**, 2000. v. 38, n. 9, p. 3448–3449.
- BACHMANN, M. H. *et al.* Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of virology**, 1997. v. 71, n. 6, p. 4241–53. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=191639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BANDECCHI, P. *et al.* Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in italy . **Veterinary immunology and immunopathology**, 1992. v. 31, n. 3–4, p. 337–345.
- _____. *et al.* Feline leukaemia virus (felv) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the pisa district of tuscanly , and attempts to control felv infection in a colony of domestic cats by vaccination. **The veterinary record**, 2006. v. 158, n. 16, p. 5–7.
- BECZKOWSKI, P. M. *et al.* Rapid evolution of the env gene leader sequence in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of general virology**, 2015. v. 96, n. 4, p. 893–903.
- BIEK, R. *et al.* Epidemiology, genetic diversity , and evolution of endemic feline immunodeficiency virus in a population of wild cougars. **Journal of virology**, 2003. v. 77, n. 17, p. 9578–9589.
- CALDAS, A. P. *et al.* Detecção do provírus da imunodeficiência f elina em gatos felina domésticos pela técnica de r eação em cadeia da p reação polimerase. somente PCR: **Pesquisa veterinária brasileira**, 2000. v. 20, n. 1, p. 20–25.
- CARPENTER, M. A. *et al.* Phylogeographic patterns of feline immunodeficiency virus genetic diversity in the domestic cat. **Virology**, 1998. v. 251, p. 234–243.

CASTRO, F. L. DE *et al.* 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. **Infection, genetics and evolution**, 2014. v. 27, p. 389–394. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.024>>.

CAXITO, F. A. *et al.* Feline immunodeficiency virus subtype b in domestic cats in minas gerais, brazil. **Veterinary research communications**, 2006a. v. 30, n. 8, p. 953–956.

_____ *et al.* Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from state of minas gerais, brazil. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 2006b. v. 58, n. 6, p. 1222–1225. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352006000600035&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CEN, S. *et al.* The interaction between hiv-1 gag and apobec3g *. **The journal of biological chemistry**, 2004. v. 279, n. 32, p. 33177–33184.

CHECKLEY, M. A.; LUTTGE, B. G.; FREED, E. O. Hiv-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. **Journal of molecular biology**, 2011. v. 410, n. 4, p. 582–608.

CHIU, Y. L.; GREENE, W. C. Multifaceted antiviral actions of apobec3 cytidine deaminases. **Trends in immunology**, 2006. v. 27, n. 6, p. 291–297.

COFFIN, J. M. Structure , replication , and recombination of retrovirus genomes : some unifying hypotheses. **Journal of general virology**, 1979. v. 42, p. 1–26.

COLSON, P. *et al.* Hiv infection en route to endogenization : two cases. **Clinical microbiology and infection**, 2014. v. 20, n. 12, p. 1280–1288. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12807>>.

CONG, W. *et al.* Toxoplasma gondii, dirofilaria immitis, feline immunodeficiency virus (fiv), and feline leukemia virus (felv) infections in stray and pet cats (*felis catus*) in northwest china: co-infections and risk factors. **Parasitology research**, 2016. v. 115, n. 1, p. 217–223.

CONTICELLO, S. G.; HARRIS, R. S.; NEUBERGER, M. S. The vif protein of hiv triggers degradation of the human antiretroviral dna deaminase apobec3g. **Current biology**, 2003. v. 13, p. 2009–2013.

COURCHAMP, F. *et al.* At-risk individuals in feline immunodeficiency virus epidemiology : evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*felis catus*). **Epidemiology and infection**, 1998. v. 121, p. 227–236.

CRAIGIE, R.; BUSHMAN, F. D. Hiv dna integration. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, 2012. v. 2, n. 7, p. 1–18.

DELVIKS-FRANKENBERRY, K. *et al.* Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. **Viruses**, 2011. v. 3, p. 1650–1680.

DORNY, P. *et al.* Serological survey of toxoplasma gondii , feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in belgium . **The veterinary record**, 2002. v. 151, n. 21, p. 626–629.

- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. Beast: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **Bmc evolutionary biology**, jan. 2007. v. 7, p. 214.
- DUARTE, A. *et al.* Phylogenetic analysis of five portuguese strains of fiv. **Archives of virology**, 2002. v. 147, n. 5, p. 1061–1070.
- DUARTE, M. A. T. *et al.* Phylogenetic analysis of portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary microbiology**, 2006. v. 9, n. 1, p. 25–27.
- EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, 2004. v. 32, n. 5, p. 1792–1797.
- ELDER, J. H. *et al.* Molecular mechanisms of fiv infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2008. v. 123, n. 1–2, p. 3–13.
- EV, P. *et al.* Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern italy . **Veterinary immunology and immunopathology**, 1994. v. 40, n. 4, p. 8042281.
- FLINT, J. *et al.* **Principles of virology**. [S.l.]: [s.n.], 2015.
- FUCHS, A.; BINZEL, L.; LONSDORFER, M. Epidemiology of felv and fiv infection in the federal republic of germany (abstract). **Tierärztliche praxis**, 1994. v. 22, n. 3, p. 1994.
- GABOR, L. *et al.* Feline immunodeficiency virus status of australian cats with lymphosarcoma. **Australian veterinary journal**, 2001. v. 79, n. 8, p. 540–545.
- GABUZDA, D. H. *et al.* Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in cd4 + t lymphocytes. **Journal of virology**, 1992. v. 66, n. 11, p. 6489–6495.
- GARG, H.; FULLER, F. J.; TOMPKINS, W. A. F. Mechanism of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated fusion. **Virology**, 2004. v. 321, n. 2, p. 274–286.
- GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in germany. **Journal of feline medicine and surgery**, 2009. v. 11, p. 985–992.
- GREENE, W. *et al.* Nucleotide sequences of australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. **Archives of virology**, 1993. v. 132, p. 369–379.
- GU, Q.; ZHANG, Z.; ORTIZ, C.; *et al.* Feline immunodeficiency virus vif n-terminal residues selectively. 2016. v. 90, n. 23, p. 10545–10557.
- _____; _____; CANO, L.; *et al.* Feline immunodeficiency virus vif n-terminal residues selectively. **Journal of virology**, 2016. v. 90, n. 23, p. 10545–10557.
- GUINDON, S. *et al.* Phyml online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. **Nucleic acids research**, 2005. v. 33, n. Web Server issue, p. W557–W559.
- HAGIWARA, M. K. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection in cats from são paulo, brazil. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, 1993. v.

30, p. 217–220.

HARARI, A. *et al.* Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human apobec3h □. 2009. v. 83, n. 1, p. 295–303.

HARRIS, R. S.; LIDDAMENT, M. T. Retroviral restriction by apobec proteins. **Nature reviews. immunology**, 2004. v. 4, n. 11, p. 868–877.

HARRUS, S. *et al.* Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in israel and their relationships with felv and fiv infections . **The veterinary record**, 2002. v. 151, n. 3, p. 2002.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. **The veterinary journal**, 1998. v. 155, n. 2, p. 123–137.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, 2012. v. 4, n. 11, p. 2684–2710.

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

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2453118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

_____; _____. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*felis catus*). **Veterinary immunology and immunopathology**, 2010. v. 134, p. 68–74. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.011>>.

_____; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of new zealand. **Journal of virology**, 2007. v. 81, n. 6, p. 2999–3004.

HENRIET, S. *et al.* Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (vif) and the human apobec-3g and apobec-3f restriction factors. **Microbiology and molecular biology reviews**, 2009. v. 73, n. 2, p. 211–232.

HOSIE, M. J. *et al.* Evolution of replication efficiency following infection with a molecularly cloned feline immunodeficiency virus of low virulence. **J. virol.**, 2002. v. 76, n. 12, p. 6062–6072. Disponível em:

<<http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/76/12/6062>>.

HOSIE, M. J. *et al.* Feline immunodeficiency abcd guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, 2009. v. 11, p. 575–584.

HOSIE, M. J. *et al.* Feline immunodeficiency virus (fiv) neutralization: a review. **Viruses**, 2011. v. 3, n. 10, p. 1870–1890.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus : setting the challenge. **Australian veterinary journal**, 2007. v. 85, n. 1–2, p. 5–12.

HU, W.; HUGHES, S. H. Hiv-1 reverse transcription. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, 2012. v. 2, n. 10, p. 1–22.

HWANG, C. K.; SVAROVSKAIA, E. S.; PATHAK, V. K. Dynamic copy choice : steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase- dependent

rnase h activity determines frequency of in vivo template switching. **Proceedings of the national academy of sciences**, 2001. v. 98, n. 21, p. 12209–12214.

IMAHASHI, M.; NAKASHIMA, M.; IWATANI, Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human apobec3 family. **Frontiers in microbiology**, 2012. v. 3, n. JUL, p. 1–7.

ISHIDA, T. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection in cats of japan . **Journal of the american veterinary medical association**, 1989. v. 194, n. 2.

JÄGER, S. *et al.* Vif hijacks cbf – β to degrade apobec3g and promote hiv–1 infection. **Nature**, 2013. v. 481, n. 7381, p. 371–375.

JÓNSSON, S. R.; ANDRÉSDÓTTIR, V. Host restriction of lentiviruses and viral countermeasures: apobec3 and vif. **Viruses**, 2013. v. 5, n. 8, p. 1934–1947.

JORDAN, H. L. *et al.* Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. **Journal of virology**, 1996. v. 70, n. 11, p. 8224–8228.

_____ *et al.* Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. **Aids research and human retroviruses**, 1998. v. 14, n. 12, p. 1087–1092.

KAKINUMA, S. *et al.* Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. Japan nuevo subtipo Denv e gag Japanese TM2, Japanese Shizuoka, and non-Japanese subtypes (U.S. and European isolates)FIV epidemiology determined that viruses with specific sequence variation are also clustered within similar geographical regions.: **Journal of virology**, 1995. v. 69, n. 6, p. 3639–46. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7745712>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC189079>>.

KANN, R. *et al.* Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from domestic cats in australia. **Australian veterinary journal**, 2006. v. 84, n. 4, p. 112–116.

KENYON, J. C.; LEVER, A. M. L. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (fiv). **Viruses**, 2011. v. 3, n. 11, p. 2192–2213.

KNOEPFEL, S. A. *et al.* In-depth analysis of g-to-a hypermutation rate in hiv-1 env dna induced by endogenous apobec3 proteins using massively parallel sequencing &. **Journal of virological methods**, 2011. v. 171, n. 2, p. 329–338. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.11.016>>.

KOBAYASHI, M. *et al.* Apobec3g targets specific virus species. **Journal of virology**, 2004. v. 78, n. 15, p. 8238–8244.

LAND, A. M. *et al.* Human immunodeficiency virus (hiv) type 1 proviral hypermutation correlates with cd4 count in hiv-infected women from kenya □. **Journal of virology**, 2008. v. 82, n. 16, p. 8172–8182.

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

LARUE, R. S. *et al.* Guidelines for naming nonprimate apobec3 genes and proteins.

Journal of virology, 2009. v. 83, n. 2, p. 494–497.

LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus : the road not taken. **Comparative immunology, microbiology & infectious diseases**, 2008. v. 31, p. 167–190.

LEE, I. T. *et al.* Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline free-roaming cats. **Journal of the american veterinary medical association**, 2002. v. 220, n. 5, p. 620–622.

LEVY, J. *et al.* 2008 american association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, 2008. v. 10, n. 3, p. 300–316.

LEVY, J. K. *et al.* 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**, 2006. v. 228, n. 3, p. 371–376.

LITSTER, A. *et al.* Diagnostic utility of cd4%:cd8low% t-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (fiv)-infected from fiv-vaccinated cats. **Veterinary microbiology**, 2014. v. 170, n. 3–4, p. 197–205. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.014>>.

LOLE, K. S. *et al.* Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype c-infected seroconverters in india, with evidence of intersubtype recombination. **Journal of virology**, 1999. v. 73, n. 1, p. 152–60. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847317>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC103818>>.

LONG, J. C.; WILLIAMS, R. C.; URBANEK, M. An e-m algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. **American journal of human genetics**, 1995. v. 56, n. 3, p. 799–810. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1801177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LUO, K. *et al.* Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human apobec3g packaging. **Journal of virology**, 2004. v. 78, n. 21, p. 11841–11852.

LURIA, B. J. *et al.* Prevalence of infectious diseases in feral cats in northern florida. **Journal of feline medicine and surgery**, 2004. v. 6, p. 287–296.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D. Hiv restriction factors and mechanisms of evasion. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, 2012. v. 2, n. 5, p. 1–16.

MANGEAT, B. *et al.* Broad antiretroviral defence by human apobec3g through lethal editing of nascent reverse transcripts. **Nature**, 2003. p. 99–103.

MARÇOLA, T. G. *et al.* Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the brazilian federal district. **Virus genes**, 2013. v. 46, n. 3, p. 546–550.

MARIN, M. *et al.* Hiv-1 vif protein binds the editing enzyme apobec3g and induces its degradation. **Nature medicine**, 2003. v. 9, n. 11, p. 1398–1403.

MARTINS, A. N. *et al.* Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency

- virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in rio de janeiro, brazil. v3`v4: **Journal of virology**, 2008. v. 82, n. 16, p. 7863–74. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550661%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2519550>>.
- MATTEUCCI, D. *et al.* Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, 1993. v. 31, n. 3, p. 494–501.
- MEDEIROS, S. De O. *et al.* Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. v3 v4: **Virology journal**, 2012. v. 9, n. 1, p. 99. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3439265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The cipes science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. **Proceedings of the 2011 teragrid conference on extreme digital discovery - tg '11**, 2011. p. 1–8. Disponível em: <<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=2016741.2016785>>.
- MIYAZAWA, T. *et al.* The genome of feline immunodeficiency virus . **Archives of virology**, 1994. v. 134.
- MOENCH, T. *et al.* The cat/feline immunodeficiency virus model for trans- mucosal transmission of aids: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum. aids. **Aids**, 1993. v. 7, n. 6, p. 797–802.
- MUIRDEN, A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an rspca hospital. **The veterinary record**, 2002. v. 150, p. 621–625.
- MÜNK, C. *et al.* Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline apobec3 genes. **Genome biology**, 2008. v. 9, n. 3, p. R48. Disponível em: <<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-3-r48>>.
- NAKAMURA, K. *et al.* Phylogenetic analysis of vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus : genetic diversity of subtype c. **Archives of virology**, 2003. v. 148, p. 783–791.
- NEGRONI, M.; BUC, H. Mechanisms of retroviral recombination. **Annual review of genetics**, 2001. p. 275–302.
- OĞUZOĞLU, T. Ç. *et al.* Prevalences of feline coronavirus (fcov), feline leukaemia virus (felv), feline immunodeficiency virus (fiv) and feline parvovirus (fpv) among domestic cats in ankara , turkey. **Revue de médecine vétérinaire**, 2013. v. 164, n. 11, p. 511–516.
- OLIVA, G. A. *et al.* Infección con el virus de la inmunodeficiencia felina : desarrollo y aplicación de una técnica de doble reacción en cadena de la polimerasa (pcr) para el diagnóstico. **Analecta veterinária**, 2000. v. 20, n. 2, p. 11–15.
- OLMSTED, R. A. *et al.* Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. **Journal of virology**, 1992. v. 66, n. 10, p. 6008–18. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=241478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PANCINO, G. *et al.* Structure and variation of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, 1993. v. 192, p. 659–662.

PARSEVAL, A. DE *et al.* Sequential cd134-cxcr4 interactions in feline immunodeficiency virus (fiv): soluble cd134 activates fiv env for cxcr4-dependent entry and reveals a cryptic neutralization epitope. **Journal of virology**, 2006. v. 80, n. 6, p. 3088–3091.

PAVLOVA, E.; KIRILYUK, V.; NAIDENKO, V. Patterns of seroprevalence of feline viruses among domestic cats and pallas' cats in daurskii reserve, russia. **Canadian journal of zoology**, 2015. p. 1–24.

PECON-SLATTERY, J.; TROYER, J. L.; *et al.* Evolution of feline immunodeficiency virus in felidae: implications for human health and wildlife ecology. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2008. v. 123, n. 1–2, p. 32–44.

_____; MCCRACKEN, C. L.; *et al.* Genomic organization, sequence divergence, and recombination of feline immunodeficiency virus from lions in the wild. **Bmc genomics**, 2008. v. 9, p. 66.

PECORARO, M. R. *et al.* Genetic diversity of argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of general virology**, 1996. v. 77, n. 9, p. 2031–2035.

PEDERSEN, N. C. *et al.* Isolation of a t-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, 1987. v. 235, n. 4790, p. 790–793.

PISTELLO, M. *et al.* Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype b. **Journal of general virology**, 1997. v. 78, n. 9, p. 2247–2257.

POESCHLA, E. M. Primate and feline lentiviruses in current intrinsic immunity research: the cat is back. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2011. v. 143, n. 3–4, p. 215–220. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.014>>.

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

PROHASKA, K. M. *et al.* The multifaceted roles of rna binding in apobec cytidine deaminase functions. **Wiley interdisciplinary reviews: rna**, 2014. v. 5, n. 4, p. 493–508.

RAMBAUT, A. **Figtree v1.4: tree figure drawing tool.**

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. **Tracer v1.6.**

RAVI, M. *et al.* Naturally acquired feline immunodeficiency virus (fiv) infection in cats from western canada: prevalence, disease associations, and survival analysis. **Canadian veterinary journal**, 2010. p. 271–276.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes a, b and c and intersubtype recombinants in ontario, canada. **Journal of general virology**, 2004. v. 85, n. 7, p. 1843–1852.

ROGOZIN, I. B. *et al.* Apobec4, a new member of the aid/apobec family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. **Cell cycle**, 2005. v. 4, n. 9, p. 1281–1285.

ROSE, K. M. *et al.* The viral infectivity factor (vif) of hiv-1 unveiled. **Trends in molecular medicine**, 2004. v. 10, n. 6, p. 291–297.

SHEEHY, A. M. *et al.* Isolation of a human gene that inhibits hiv-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. **Nature**, 2002. v. 418, n. 6898, p. 646–650.

SILVA, F. S. *et al.* Ocorrência do subtipo b do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos região sul do estado do rio grande do sul, brasil. v3 v48 sequencias todos BRS Brasil: **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 2014. v. 66, n. 1, p. 1–6.

SODORA, D. L. *et al.* Identification of three feline immunodeficiency virus (fiv) env gene subtypes and comparison of the fiv and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. As primeiras duas regiões variáveis acontecem na região líder, e não estão presentes na proteína madura, as regiões variáveis V3-V6 se encontram em SU e V7-V9 na TM. animais infectados em ameica do norte subtipos A B e C: **Journal of virology**, 1994. v. 68, n. 4, p. 2230–8. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SOMA, T. Recent prevalence of feline coronavirus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in japan (abstract). **Journal of environment and disease**, 2008. v. 16, n. 1–2, p. 1–5.

SOUZA, H.; TEIXEIRA, C.; GRAÇA, R. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do rio de janeiro (abstract). **Clínica veterinária**, 2002. v. 36, p. 14–21.

SOVA, P.; VOLSKY, D. J. Efficiency of viral dna synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1 cp. **Journal of virology**, 1993. v. 67, n. 10, p. 6322–6326.

STEINRIGL, A. *et al.* Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades a and b to central europe and identifies diverse variants of clade b. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2010. v. 134, n. 1–2, p. 82–89. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.013>>.

_____; KLEIN, D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in central europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. **Journal of general virology**, 2003. v. 84, n. 5, p. 1301–1307.

STICKNEY, A. L.; DUNOWSKA, M.; CAVE, N. J. Sequence variation of the feline immunodeficiency virus genome and its clinical relevance. **The veterinary record**, 2013. v. 172, n. 23, p. 607–14. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749359>>.

STREBEL, K. *et al.* The hiv “a” (sor) gene product is essential for virus infectivity. **Nature**, 1987. v. 328, n. 20, p. 728–730.

TAKAORI-KONDO, A. Apobec family proteins: novel antiviral innate immunity. **International journal of hematology**, 2006. v. 83, n. 3, p. 213–216. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1532/IJH97.05187>>.

TAMURA, K. *et al.* Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, dez. 2013. v. 30, n. 12, p. 2725–9.

TANIWAKI, S. A.; FIGUEIREDO, A. S.; ARAUJO, J. P. Virus-host interaction in feline immunodeficiency virus (fiv) infection. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 2013. v. 36, n. 6, p. 549–557. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.001>>.

TEIXEIRA, B. M. *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de belo horizonte. *gag*: **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 2007. v. 59, n. 4, p. 939–942.

TEIXEIRA, B. M. *et al.* Genetic diversity of brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. v3 v5: **Archives of virology**, 2010. v. 155, n. 3, p. 379–384.

TEIXEIRA, B. M. *et al.* Feline immunodeficiency virus in south america. **Viruses**, 2012. v. 4, n. 3, p. 383–396.

TOMONAGAT, K.; MIKAMI, T. Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. **Journal of general virology**, 1996. v. 77, p. 1611–1621.

TOMPKINS, M.; TOMPKINS, W. Lentivirus-induced immune dysregulation. **Veterinary immunology and immunopathology**, 2008. v. 144, n. 5, p. 724–732.

TROYER, J. L. *et al.* Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among felidae and hyaenidae species. **Journal of virology**, 2005. v. 79, n. 13, p. 8282–8294.

TROYER, R. M. *et al.* Accessory genes confer a high replication rate to virulent feline. **Journal of virology**, 2013. v. 87, n. 14, p. 7940–7951.

UEMA, M. *et al.* Feline immunodeficiency virus subtype c is prevalent in northern part of taiwan (abstract). **Journal of veterinary medical science**, 1999. v. 61, n. 2, p. 197–199.

WEAVER, E. A. *et al.* Phylogenetic analyses of texas isolates indicate an evolving subtype of the clade b feline immunodeficiency viruses. **Journal of virology**, 2004. v. 78, n. 4, p. 2158–63. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=369484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WEAVER, E. A. A detailed phylogenetic analysis of fiv in the united states. **Plos one**, 2010. v. 5, n. 8.

WEDEKIND, J. E. *et al.* Messenger rna editing in mammals: new members of the apobec family seeking roles in the family business. **Trends in genetics**, 2003. v. 19, n. 4, p. 207–216.

WINKLER, I. G.; LO, M.; FLOWER, R. L. P. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats : a seroepidemiological study. **Journal of clinical microbiology**, 1999. v. 37, n. 9, p. 2848–2851.

YAMAMOTO, J. *et al.* Pathogenesis of experimentally induced feline

immunodeficiency virus infection in cats. **American journal of veterinary research**, 1988. v. 49, n. 8, p. 1246–1258. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/2459996>>.

_____ *et al.* Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental united states and canada and possible mode of transmission (abstract). **Journal of the amerirican veterinary medical association**, 1989. v. 194, n. 2, p. 213–220.

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

YAN, N.; CHEN, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. **Nature iimunology**, 2013. v. 13, n. 3, p. 214–222.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of fiv and felv infections in cats in istanbul. **Journal of feline medicine and surgery**, 2000. v. 2, n. 1, p. 69–70.

YOSHIKAWA, R. *et al.* A naturally occurring domestic cat apobec3 variant confers resistance to feline immunodeficiency virus infection. **Journal of virology**, 2016. v. 90, n. 1, p. 474–485.

YU, X. *et al.* Induction of apobec3g ubiquitination and degradation by an hiv-1 vif-cul5-scf complex. **Science**, 2003. v. 1056, n. 2003, p. 3–8.

ZHANG, H. *et al.* The cytidine deaminase cem15 induces hypermutation in newly synthesized hiv-1 dna. **Nature**, 2003. v. 424, n. 6944, p. 94–98.

ZHANG, W. *et al.* Distinct determinants in hiv-1 vif and human apobec3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. **Plos one**, 2008. v. 3, n. 12, p. 66–72.

ZHENG, Y.-H.; JEANG, K.-T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. **Retrovirology**, 2012. v. 9, n. 1, p. 112.

Tables.

Table 1. Polymorphisms, genotypes and frequencies in the A3Z3 from FIV positive cats in Porto Alegre city.

Polymorphism	Codons	Genotype	Animals N=30 (%)
A65S	TCA/TCA	TT	5 (16.7 %)
	TCA/GCA	TG	18 (60 %)
	GCA/GCA	GG	5 (16.7 %)
	GCA/ATA	GA	2 (6.7 %)
R68Q	CAG/CGG	AG	10 (33.3 %)
	CGG/CGG	GG	20 (66.7 %)
A94T	ACG/GCG	AG	10 (33.3 %)
	GCG/GCG	GG	20 (66.7 %)
V96I	ATG/GTC	AG	4 (13.3 %)
	GTC/GTC	GG	26 (86.7 %)

Table 2. Haplotypes and frequencies of the gene A3Z3 found in the studied population of FIV positive cats in Porto Alegre city and comparison of frequencies with the previous study in the same conditions.

# (YOSHIKAWA <i>et al.</i> , 2016)	Haplotype	Frequency (N)	Frequency in the same population (N) (CASTRO, F. L. DE <i>et al.</i> , 2014)
I	GGGG	0.5 (30)	0.55045871 (120)
II	TGGG	0.23 (14)	0.26605505 (58)
III	TAAG	0.17 (10)	0.09174312 (20)
IV	TGGA	0.07 (4)	0.0412844 (9)
V	AGGG	0.3 (2)	0.03669725 (8)
VI	GGGA	0 (0)	0.00917431 (2)
VII	TAGG	0 (0)	0.00458716 (1)
	Total	1 (60)	1 (218)

Supporting Material.

Table S1. Primers used in this study to amplify proviral genes (*env* and *vif*) from exon 3 of A3Z3 positives cats to FIV.

Region	Primer name	Sequence (5'-3')	Size
Exon 3 A3Z3	A3H2F	TCATCCCCAATGGCACCCACAGC	590pb
	A3H3R	TCAAACCTCTGAGACGGAGGAGGAG	
Extern primers	VIF_FIV_PF	CTTCCTGAAGGGGATGAGTG	3.1kb
	ENV_PR	CCTARTTCTTGCATAGCRAAAGC	
Intern Primers Vif	VIF_FIV_PF	CTTCCTGAAGGGGATGAGTG	756pb
	VIF_FIV_PR	ATCTCTCCATTCATAGYTCTCC	
Intern Primers Env	ENV2-3_PF	GAATGAGACTATAACAGGAC	831pb
	ENV2-3_PR	CAAGACCAATTTCCAGCAAT	

5 DISCUSSÃO

O FIV é um vírus endêmico, de grande importância no Brasil, que afeta gatos domésticos. A população de gatos errantes no Brasil é elevada, e a prevalência neste tipo de população é maior do que para os animais mantidos em casa. No entanto, muitos animais que têm livre acesso à rua tem uma probabilidade maior de se contagiar. Os animais positivos não apresentam sintomas durante um período longo de tempo, contribuindo assim para a disseminação do vírus. Estes animais podem acabar se expondo a muitos outros patógenos, desenvolvendo infecções recorrentes que finalmente complicam o quadro clínico quando inicia a fase de imunodeficiência (HOSIE *et al.*, 2009).

A classificação dos organismos permite inferir uma história evolutiva. A realização de mais estudos filogenéticos do FIV permitiria uma melhor definição de cada subtipo do FIV e uma melhor compreensão da epidemiologia da doença. No Brasil, até hoje, somente foi identificado o subtipo B (MARTINS, A. N. *et al.*, 2008; BRAUN; JUNQUEIRA; VERLI; *et al.*, 2014).

No laboratório de Virologia o diagnóstico de FIV se realiza por uma PCR com alvo na amplificação do gene *gag* proviral. Existe aproximadamente um estoque de 60 amostras positivas para FIV, no entanto, a amplificação direta dos genes *env* e *vif* se mostrou ineficiente, conseguindo no final amplificar e sequenciar somente 50 % das amostras para *env* e unicamente 25 % para *vif*. Isto está relacionado com a falta de sequências disponíveis nos bancos de dados, e com a variação entre os FIV circulantes. Atualmente existem unicamente sete sequências completas do FIV de gatos domésticos no GenBank as quais foram utilizadas para o desenho dos primers para a amplificação do gene *vif*. A dificuldade de amplificar os genes *env* e *vif*, inicialmente encontrada nesse trabalho, foi parcialmente vencida pela aplicação de uma nested-PCR, na qual inicialmente foi amplificada uma região de 3 kb utilizando primers que anelam em regiões relativamente conservadas no genoma viral.

Estudos realizados em alguns estados do país mostraram que o subtipo circulante é o B (CAXITO *et al.*, 2006; MARÇOLA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2010). No presente trabalho o subtipo B também predominou. Porém, nossas análises mostraram recombinação com o subtipo F em 13 % das amostras analisadas. Nenhum outro estudo realizado no Brasil avaliou a possibilidade de recombinação nas sequências, apesar desse fenômeno ter sido reportado em outros países

(BACHMANN *et al.*, 1997; CARPENTER *et al.*, 1998; HAYWARD; RODRIGO, 2008, 2010; REGGETI; BIENZLE, 2004).

A distribuição das cepas virais em animais está fortemente influenciada pelas práticas humanas. Assim, atualmente a facilidade de ir de um país para outro e mesmo a facilidade do transporte de animais pode beneficiar a disseminação do vírus entre regiões geográficas distantes, permitindo eventos de recombinação e incrementando a diversidade viral.

Este é o primeiro estudo que data a introdução do subtipo B no Brasil. Foram avaliadas um total de 74 sequências brasileiras, incluindo sequências de estudos prévios (47) e do presente estudo (27). As análises mostraram cinco clados altamente suportados, o que permite concluir que houveram cinco entradas no Brasil do FIV-B entre 1981 e 1991. É importante observar que esse dado pode mudar à medida que mais estudos de epidemiologia molecular forem realizados e mais sequências de FIV forem geradas, ampliando o número de amostras avaliadas. É o primeiro estudo no mundo também em datar o surgimento deste subtipo viral, baseado na estimativa do seu ancestral comum mais recente (MRCA).

A compreensão da epidemiologia molecular reflete diretamente no desenvolvimento de novas e mais eficazes estratégias de prevenção, diagnóstico, tratamento e controle. Apesar de a vacinação contra o FIV no Brasil ainda não ter sido implementada, estudos de filogenia das cepas de FIV circulantes no Brasil poderiam permitir o desenvolvimento de estudos aprimorados para o desenvolvimento de novas vacinas para as cepas circulantes. Além disso, estudos moleculares sobre os vírus circulantes poderiam contribuir com a melhoria dos diagnósticos da infecção, pois a precisão do diagnóstico por PCR de FIV é variável entre laboratórios e depende das cepas circulantes e a variação entre as sequências (LITSTER *et al.*, 2014). Consequentemente, o enriquecimento das bases de dados com mais sequências permite aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico molecular.

No Brasil não é possível receitar medicamentos anti-retrovirais por médicos veterinários. Essa restrição deveria mudar, considerando que o tratamento adequado beneficiaria os pacientes. Entretanto, antes de ser implementado, o uso de anti-retrovirais, várias dificuldades precisariam ser resolvidas tais como: falta de experiência com o uso dos medicamentos e falta de parâmetros precisos para o acompanhamento dos animais (ex: contagem de células CD4⁺, relação CD4⁺: CD8⁺, e carga viral).

A taxa evolutiva de um gene é a medida das mudanças ocorridas ao longo do

tempo (BRAUN; JUNQUEIRA; VERLI; *et al.*, 2014). Em nosso estudo a taxa evolutiva estimada para o gene *env* foi de 1.3×10^{-3} substituições/sítio por ano. Este valor foi similar ao estimado em outros estudos para FIV (1.16×10^{-3}) (BECZKOWSKI *et al.*, 2015). Em HIV, foi estimado que a região V3 tem uma taxa evolutiva de 2.3×10^{-3} a 6.7×10^{-3} e o gene *env* completo, de 1.0×10^{-3} e 1.7×10^{-3} . Esses dados demonstram que a região V3 está submetida a uma forte pressão de seleção pelo sistema imune (LEVY *et al.*, 2008). Provavelmente o mesmo ocorre com essa região do gene *env* de FIV. Com respeito às sequências de *vif* analisadas, observou-se que, na população de estudo, estas são mais conservadas do que as sequências de *env*. No presente estudo, além das 7 sequências do genoma completo disponíveis nos bancos de dados, mais 15 sequências do gene *vif* completo foram depositadas nos bancos de dados com número de acesso (KX668630 - KX668644), o que contribui com o atual conhecimento sobre variabilidade de Vif em FIV.

O gene A3 codifica fatores de restrição amplamente estudados, pois são importantes atores da imunidade intrínseca contra retrovírus à medida que induzem hipermutações no genoma viral. Estudos prévios relacionaram a presença de um SNP em A3 de felinos com a suscetibilidade à infecção por FIV e encontrou-se uma correlação positiva entre um dos haplótipos descritos e a resistência à infecção por retrovírus em gatos domésticos (CASTRO *et al.*, 2014). Além disso, a resistência à degradação da A3 mediada por Vif foi avaliada *in vitro*, e um dos haplótipos de A3 foi descrito como resistente à degradação por Vif (YOSHIKAWA *et al.*, 2016). Naquele trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito direto da proteína A3Z3 na geração de hipermutações em *env* e *vif* de gatos positivos. Isso poderia demonstrar se algum dos haplótipos de A3 é resistente à degradação pela Vif, conseguindo efetivamente hipermutar os DNA provirais (YOSHIKAWA *et al.*, 2016). Nesse estudo buscamos identificar os haplótipos de A3Z3 na população de gatos FIV positivos estudada, além de tentar estabelecer uma correlação com hipermutações e variabilidade nas sequências de *env* e *vif*. Os resultados obtidos aqui mostraram um baixo ou indetectável número de hipermutações nesses dois genes, o que pode ser devido ao baixo número de sequências examinadas por amostra, porque a amostra utilizada para comparação no Hypermut 2.0 foi inadequada, ou porque efetivamente, não haviam hipermutações nas sequências analisadas.

6 CONCLUSÕES

1. Os dados obtidos no estudo confirmam a presença do FIV-B circulante em gatos domésticos na cidade de Porto Alegre e ratificam a importância deste subtipo na epidemiologia do vírus no Brasil.
2. Eventos de recombinação entre os subtipos B e F de FIV foram demonstrados.
3. Foram identificados cinco clados altamente suportados identificados como A1, B1, B2, C e D, indicando que houveram cinco entradas do vírus no Brasil.
4. As cinco entradas do vírus no Brasil ocorreram entre 1981 e 1991.
5. Os clados B1 e B2 possuem um ancestral comum, mas o alto suporte de cada grupo sugere uma introdução independente.
6. Sequências do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul compõem o clado A, os outros clados agrupam sequências de Minas Gerais.
7. A taxa evolutiva do gene envfo FIV foi estimada em 1.3×10^{-3} .
8. As sequências de Vif são conservadas, foi demonstrada uma identidade de 86 a 99 % entre as 15 sequências analisadas.
9. Cinco haplótipos dos sete descritos para A3 de felinos foram identificados na população estudada.
10. Não foram detectadas hipermutações nas sequências estudadas.
11. Estudos mais profundos com amostras de outros países e outras regiões do Brasil precisam ser desenvolvidos para melhorar a compreensão da epidemiologia do vírus e esclarecer a atual classificação dos subtipos virais, que ainda é confusa.

REFERÊNCIAS

- AFFRANCHINO, J. L.; GONZÁLEZ, S. A. Understanding the process of envelope glycoprotein incorporation into virions in simian and feline immunodeficiency viruses. **Viruses**, Basel, v. 6, n. 1, p. 264–283, Jan 2014.
- ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 19, n. 5, p. 421–434, May 2003a.
- _____; _____. Feline immunodeficiency virus is concentrated in milk early in lactation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 19, n. 3, p. 245–253, Mar 2003b.
- ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, Washington, v. 55, n. 4, p. 539–52. Aug 2006.
- ARIAS, J. F. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, 2012. v. 14, n. 3, p. 1-12, Aug 2012.
- ARJONA, A. *et al.* Sero epidemiological 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, Sep 2000.
- BACHMANN, M. H. *et al.* Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 6, p. 4241–53, Jun 1997.
- BANDECCHI, P. *et al.* Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 31, n. 3–4, p. 337–345, Mar, 1992.
- _____. *et al.* Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the pisa district of tuscanly , and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. **The Veterinary Record**, London, v. 158, n. 16, p. 5–7, Apr 2006.
- BECZKOWSKI, P. M. *et al.* Rapid evolution of the *env* gene leader sequence in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, London, v. 96, n. 4, p. 893–903, Apr 2015.
- BIEK, R. *et al.* Epidemiology, genetic diversity , and evolution of endemic feline immunodeficiency virus in a population of wild cougars. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 77, n. 17, p. 9578–9589, Sep 2003.
- CALDAS, A. P. *et al.* Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 20–25, jan 2000.
- CARPENTER, M. A. *et al.* Phylogeographic patterns of feline immunodeficiency virus genetic diversity in the domestic cat. **Virology**, New York, v. 251, p. 234–243, Nov 1998.

CASTRO, F. L. DE *et al.* 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. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 27, p. 389–394, Oct 2014

CAXITO, F. A. *et al.* Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 953–956. Nov 2006.

_____ *et al.* Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from state of Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1222–1225, Dec 2006b.

CEN, S. *et al.* The interaction between HIV-1 gag and APOBEC3G. **The Journal of Biological Chemistry** Baltimore, v. 279, n. 32, p. 33177–33184, May 2004.

CHECKLEY, M. A.; LUTTGE, B. G.; FREED, E. O. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 410, n. 4, p. 582–608 Jul 2011.

CHIU, Y. L.; GREENE, W. C. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 291–297, Jun 2006.

COFFIN, J. M. Structure , replication , and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. **Journal of General Virology**, London, v. 42, p. 1–26, Jan 1979

COLSON, P. *et al.* HIV infection en route to endogenization : two cases. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 20, n. 12, p. 1280–1288, Dec 2014.

CONG, W. *et al.* *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 1, p. 217–223, Jan 2016

CONTICELLO, S. G.; HARRIS, R. S.; NEUBERGER, M. S. The vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral dna deaminase APOBEC3G. **Current Biology**, London, v. 13, p. 2009–2013, Nov 2003.

COURCHAMP, F. *et al.* At-risk individuals in feline immunodeficiency virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 121, p. 227–236, Aug 1998.

CRAIGIE, R.; BUSHMAN, F. D. HIV DNA integration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 2, n. 7, p. 1–18, Jul 2012.

DELVIKS-FRANKENBERRY, K. *et al.* Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. **Viruses**, Basel, v. 3, p. 1650–1680, Sep 2011.

DORNY, P. *et al.* Serological survey of *Toxoplasma gondii* , feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in belgium . **The Veterinary Record**, London, v. 151, n. 21, p. 626–629, Nov 2002.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. Beast: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 214, Nov. 2007.

DUARTE, A. *et al.* Phylogenetic analysis of five portuguese strains of fiv. **Archives of**

Virology, Wien, v. 147, n. 5, p. 1061–1070, May 2002.

DUARTE, M. A. T. *et al.* Phylogenetic analysis of portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 25–27, Apr 2006

EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 2004. v. 32, n. 5, p. 1792–1797.

ELDER, J. H. *et al.* Molecular mechanisms of FIV infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 123, n. 1–2, p. 3–13, May 2008.

EV, P. *et al.* Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern Italy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 8042281, Apr 1994.

_____. Reverse Transcription and Integration. *In*: FLINT, J *et al.* (Ed.). **Principles of Virology**. 4 ed. Washington: ASM Press, 2015. Cap. 7, p. 188-223.

FUCHS, A.; BINZEL, L.; LONSDORFER, M. Epidemiology of FeLV and FIV infection in the Federal Republic of Germany (abstract). **Tierärztliche Praxis**, Stuttgart, v. 22, n. 3, p. 273-277, June 1994.

GABOR, L. *et al.* Feline immunodeficiency virus status of australian cats with lymphosarcoma. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 79, n. 8, p. 540–545, Aug 2001.

GABUZDA, D. H. *et al.* Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 66, n. 11, p. 6489–6495, Nov, 1992.

GARG, H.; FULLER, F. J.; TOMPKINS, W. A. F. Mechanism of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated fusion. **Virology**, New York, v. 321, n. 2, p. 274–286. Apr 2004.

GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 11, p. 985–992, Dec 2009.

GÓMEZ, N. V. *et al.* Evaluation of different antiretroviral drug protocols on naturally infected feline immunodeficiency virus (FIV) cats in the late phase of the asymptomatic stage of infection. **Viruses**, Basel. p. 924–939, June 2012.

GREENE, W. *et al.* Nucleotide sequences of australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 132, p. 369–379, Sep 1993.

GU, Q.; ZHANG, Z.; CANO, L.; *et al.* Feline immunodeficiency virus vif n-terminal residues selectively. v. 90, n. 23, p. 10545–10557, Nov 2016.

GUINDON, S. *et al.* Phyml online a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, n. Web Server issue, p. W557–W559, July 2005.

HAGIWARA, M. K. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection in cats from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30,

p. 217–220, 1993.

HARARI, A. *et al.* Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 1, p. 295–303, Jan 2009.

HARRIS, R. S.; LIDDAMENT, M. T. Retroviral restriction by apobec proteins. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 4, n. 11, p. 868–877, Nov 2004.

HARRUS, S. *et al.* Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **The Veterinary Record**, London, v. 151, n. 3, p. 82–85, July 2002.

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

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 11, p. 2684–2710, Oct 2012.

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

_____; _____. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*felis catus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 134, p. 68–74, Mar 2010.

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

HENRIET, S. *et al.* Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (vif) and the human APOBEC3G and APOBEC-3F restriction factors. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington, v. 73, n. 2, p. 211–232, June 2009

HOSIE, M. J. *et al.* Evolution of replication efficiency following infection with a molecularly cloned feline immunodeficiency virus of low virulence. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 12, p. 6062–6072, June 2002.

HOSIE, M. J. *et al.* Feline immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 11, n. 7, p. 575–584, July 2009.

HOSIE, M. J. *et al.* Feline immunodeficiency virus (FIV) neutralization: a review. **Viruses**, Basel, v. 3, n. 10, p. 1870–1890, Oct 2011.

HOSIE, M. J.; BEATTY, J. A. Vaccine protection against feline immunodeficiency virus : setting the challenge. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 85, n. 1–2, p. 5–12, Jan 2007

HU, W.; HUGHES, S. H. HIV-1 reverse transcription. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 2, n. 10, p. 1–22, Oct 2012.

HWANG, C. K.; SVAROVSKAIA, E. S.; PATHAK, V. K. Dynamic copy choice : steady state between murine leukemia virus polymerase and polymerase- dependent rna H activity determines frequency of *in vivo* template switching. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 98, n. 21, p. 12209–12214, Oct 2001.

IDEXX Laboratories, SNAP FIV/FeLV Combo Test. Disponível em <<https://www.idexx.com/small-animal-health/products-and-services/snap-fiv-felvcombo-test.ht>>. Acesso em: 20 dez. 2016

ILINA, T. et al. Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase - Associated Ribonuclease H Activity. **Biology**, Basel, v. 1, n. 3, p. 521-541, 2012.

IMAHASHI, M.; NAKASHIMA, M.; IWATANI, Y. Antiviral mechanism and biochemical basis of the human APOBEC3 family. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 3, p. 1–7, Jul 2012

ISHIDA, T. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan . **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 194, n. 2, Jan 1989.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: 2015 release. London, 2016. Disponível em: <<https://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>, Acesso em: 20 nov. 2016.

JÄGER, S. *et al.* Vif hijacks CBF – β to degrade APOBEC3G and promote HIV–1 infection. **Nature**, London, v. 481, n. 7381, p. 371–375, Dec 2013.

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.

JORDAN, H. L. *et al.* Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 8224–8228, Nov1996.

_____ *et al.* Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York,. v. 14, n. 12, p. 1087–1092, Aug 1998.

KAKINUMA, S. *et al.* 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. 3639–46, June 1995.

KANN, R. *et al.* Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from domestic cats in Australia. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales,. v. 84, n. 4, p. 112–116. Apr 2006

KENYON, J. C.; LEVER, A. M. L. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). **Viruses**, Basel, v. 3, n. 11, p. 2192–2213 Nov 2011.

KNOEPFEL, S. A. *et al.* In-depth analysis of G-to-A hypermutation rate in HIV-1 env DNA induced by endogenous APOBEC3 proteins using massively parallel sequencing. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 171, n. 2, p. 329–338, Feb 2011.

KOBAYASHI, M. *et al.* APOBEC3G targets specific virus species. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 15, p. 8238–8244, Aug 2004.

LAND, A. M. *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 proviral hypermutation correlates with CD4 count in HIV-infected women from Kenya. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, n. 16, p. 8172–8182 Aug 2008.

LAPPIN M. R. Polysystemic Viral Disease. In: NELSON R. E.; COUTO C. G. (Ed.). **Small Animal Internal Medicine**. 5 ed. CITY. Elsevier, 2014, p. 1347-1350

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

LARUE, R. S. *et al.* Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 2, p. 494–497, Jan 2009.

LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: the road not taken. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, p. 167–190, Mar 2008.

LEE, I. T. *et al.* Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline free-roaming cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 220, n. 5, p. 620–622, Mar 2002.

LEVY, J. *et al.* 2008 american association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine And Surgery**, London, v. 10, n. 3, p. 300–316, July 2008.

LEVY, J. K. *et al.* 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**, Ithaca, v. 228, n. 3, p. 371–376, Feb 2006

LITSTER, A. *et al.* Diagnostic utility of CD4%:CD8low% T-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (FIV)-infected from FIV-vaccinated cats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 170, n. 3–4, p. 197–205, Jan 2014.

LOLE, K. S. *et al.* Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in india, with evidence of intersubtype recombination. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 1, p. 152–60, Jan 1999.

LONG, J. C.; WILLIAMS, R. C.; URBANEK, M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 56, n. 3, p. 799–810, Mar 1995.

LUO, K. *et al.* Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, n. 21, p. 11841–11852, Nov 2004.

LURIA, B. J. *et al.* Prevalence of infectious diseases in feral cats in northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 6, p. 287–296, Oct 2004.

MALIM, M. H.; BIENIASZ, P. D. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 2, n. 5, p. 1–16, May 2012.

MANGEAT, B. *et al.* Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. **Nature**, London, p. 99–103, July 2003.

MARÇOLA, T. G. *et al.* 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, June 2013.

- MARIN, M. *et al.* HIV-1 vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 11, p. 1398–1403, Nov 2003.
- MARTINS, A. N. *et al.* Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. v3'v4: **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 16, p. 7863–7874, Aug 2008.
- MATTEUCCI, D. *et al.* Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 3, p. 494–501, Mar 1993.
- MEDEIROS, S. De O. *et al.* Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. v3 v4: **Virology Journal**, London v. 9, n. 1, p. 99, May 2012.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. The cipes science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. **Proceedings of the 2011 teragrid conference on extreme digital discovery - TG '11**, La Jolla, p. 1–8, July 2011
- MIYAZAWA, T. *et al.* The genome of feline immunodeficiency virus . **Archives of Virology**, v. 134, p 221-234, Wien 1994.
- MOENCH, T. *et al.* The cat/feline immunodeficiency virus model for trans- mucosal transmission of AIDS: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum. **AIDS**. San Francisco, v. 7, n. 6, p. 797–802, June 1993.
- MUIRDEN, A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an rspca hospital. **The Veterinary Record**, London, v. 150, p. 621–625, May 2002
- MÜNK, C. *et al.* Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline apobec3 genes. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 48-, Mar 2008.
- _____; 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. 1, p. 71, May 2012.
- NAKAMURA, K. *et al.* Phylogenetic analysis of vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus : genetic diversity of subtype C. **Archives of Virology**, Wien, 2003. v. 148, p. 783–791, Apr 2003.
- NEGRONI, M.; BUC, H. Mechanisms of retroviral recombination. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto 2001. p. 275–302.
- OĞUZOĞLU, T. Ç. *et al.* Prevalences of feline coronavirus (FCoV), feline leukaemia virus (FeLV), feline immunodeficiency virus (FIV) and feline parvovirus (FPV) among domestic cats in Ankara, Turkey. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 164, n. 11, p. 511–516, 2013.
- OLIVA, G. A. *et al.* Infección con el virus de la inmunodeficiencia felina: desarrollo y aplicación de una técnica de doble reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico. **Analecta Veterinária**, La Plata, v. 20, n. 2, p. 11–15, 2
- OLMSTED, R. A. *et al.* Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects. **Journal of Virology**, Baltimore, v.

66, n. 10, p. 6008–18, Oct 1992.

PANCINO, G. *et al.* Structure and variation of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology**, New York, v. 192, p. 659–662, Feb 1993.

PARSEVAL, A. DE *et al.* Sequential CD134-Cxcr4 interactions in feline immunodeficiency virus (FIV): soluble CD134 activates FIV env for CXCR4-dependent entry and reveals a cryptic neutralization epitope. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 6, p. 3088–3091, Mar 2006.

PAVLOVA, E.; KIRILYUK, V.; NAIDENKO, V. Patterns of seroprevalence of feline viruses among domestic cats and pallas' cats in Daurskii Reserve, Russia. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, p. 1–24, Sep 2015.

PECON-SLATTERY, J.; TROYER, J. L.; *et al.* Evolution of feline immunodeficiency virus in felidae: implications for human health and wildlife ecology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 32-44, May 2008.

_____; MCCRACKEN, C. L.; *et al.* Genomic organization, sequence divergence, and recombination of feline immunodeficiency virus from lions in the wild. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 66, Feb 2008.

PECORARO, M. R. *et al.* Genetic diversity of argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, London, v. 77, n. 9, p. 2031–2035, Sep 1996

PEDERSEN, N. C. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, New York, v. 235, n. 4790, p. 790–793, Feb 1987.

PISTELLO, M. *et al.* Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. **Journal of General Virology**, London, v. 78, n. 9, p. 2247–2257, Sep 1997

POESCHLA, E. M. Primate and feline lentiviruses in current intrinsic immunity research: the cat is back. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 143, n. 3–4, p. 215–220, Oct 2011.

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

PROHASKA, K. M. *et al.* The multifaceted roles of rna binding in APOBEC cytidine deaminase functions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Hoboken, v. 5, n. 4, p. 493–508. July 2014.

PU, R. *et al.* Dual-subtype FIV vaccine (Fel-o-vax® FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 7, n. 1, p. 65–70, Feb 2005.

RAMBAUT, A. **Figtree v1.4: tree figure drawing tool.**

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. **Tracer v1.6.**

RAVI, M. *et al.* Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western canada: prevalence, disease associations, and survival analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 3, p. 271-276, Guelph, Mar 2010.

- REGGETI, F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. **Journal of General Virology**, London, v. 85, n. 7, p. 1843–1852, July 2004.
- ROGOZIN, I. B. *et al.* 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, Sep 2005.
- ROSE, K. M. *et al.* The viral infectivity factor (vif) of HIV-1 unveiled. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 291–297, June 2004.
- SHEEHY, A. M. *et al.* Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. **Nature**, London, v. 418, n. 6898, p. 646–650, Aug 2002.
- SILVA, F. S. *et al.* Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 1, p. 1–6, Jul 2014.
- SODORA, D. L. *et al.* Identification of three feline immunodeficiency virus (fiv) env gene subtypes and comparison of the fiv and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 2230–8, Apr 1994.
- SOMA, T. Recent prevalence of feline coronavirus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in Japan (abstract). **Journal of Environment and Disease**, London, v. 16, n. 1–2, p. 1–5, Dec 2008.
- SOUZA, H.; TEIXEIRA, C.; GRAÇA, R. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro (abstract). **Clínica Veterinária**, Maringá, v. 36, p. 14–21, oct 2002.
- SOVA, P.; VOLSKY, D. J. Efficiency of viral dna synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**. Baltimore, v. 67, n. 10, p. 6322–6326, Oct 1993.
- STEINRIGL, A. *et al.* Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades a and b to central europe and identifies diverse variants of clade B. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, London, v. 84, n. 5, p. 1301–1307, May 2003
- _____; 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, May 2003
- STICKNEY, A. L.; DUNOWSKA, M.; CAVE, N. J. Sequence variation of the feline immunodeficiency virus genome and its clinical relevance. **The Veterinary Record**, London, v. 172, n. 23, p. 607–14, June 2013.
- STOYE J. P. *et al.* Family Retroviridae. In: KING, A. M. Q (9 Ed). *Virus Taxonomy*. 9 report (CITY). **Elsevier**, p. 477- 495, 2012,
- STREBEL, K. *et al.* The HIV “A” (sor) gene product is essential for virus infectivity. **Nature**, London, v. 328, n. 20, p. 728–730, Aug 1987.
- TAKAORI-KONDO, A. Apobec family proteins: novel antiviral innate immunity.

- International Journal of Hematology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 213–216, Apr 2006.
- TAMURA, K. *et al.* Mega 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 12, p. 2725–9. Dez. 2013.
- TANIWAKI, S. A.; FIGUEIREDO, A. S.; ARAUJO, J. P. Virus-host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 549–557, Dec 2013.
- TEIXEIRA, B. M. *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *gag*: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 939–942, jun 2007.
- TEIXEIRA, B. M. *et al.* Genetic diversity of brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. v3 v5: **Archives of Virology**, Wien, v. 155, n. 3, p. 379–384, Mar 2010.
- TEIXEIRA, B. M. *et al.* Feline immunodeficiency virus in South America. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 3, p. 383–396, Mar 2012.
- TOMONAGAT, K.; MIKAMI, T. Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 1611–1621, Aug 1996.
- TOMPKINS, M.; TOMPKINS, W. Lentivirus-induced immune dysregulation. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, Amsterdam, v. 144, n. 5, p. 724–732, May 2008.
- TROYER, J. L. *et al.* 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, July 2005.
- TROYER, R. M. *et al.* Accessory genes confer a high replication rate to virulent feline. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 14, p. 7940–7951, July 2013
- UEMA, M. *et al.* Feline immunodeficiency virus subtype C is prevalent in northern part of Taiwan (abstract). **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 61, n. 2, p. 197–199, Feb 1999
- WEAVER, E. A. *et al.* Phylogenetic analyses of texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. **Journal of virology**, Washington, v. 78, n. 4, p. 2158–63, Feb 2004.
- WEAVER, E. A. A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. **Plos one**, San Francisco v. 5, n. 8, p. 1-9, Aug 2010.
- WEDEKIND, J. E. *et al.* 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, 2003.
- WEISS R. A. How does HIV cause AIDS. **Science**, New York, v. 260, n. 8, p 1273-1279, May1993
- WINKLER, I. G.; LO, M.; FLOWER, R. L. P. Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats : a seroepidemiological study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 9,

p. 2848–2851, Sep 1999.

YAMAMOTO, J. *et al.* Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 8, p. 1246–1258, Aug 1988.

_____ *et al.* Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental united states and canada and possible mode of transmission (abstract). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 194, n. 2, p. 213–220, Jan 1989.

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

YAN, N.; CHEN, Z. J. Intrinsic antiviral immunity. **Nature Immunology**, New York, v. 13, n. 3, p. 214–222, Feb 2013.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 2, n. 1, p. 69–70, Mar 2000.

YOSHIKAWA, R. *et al.* A naturally occurring domestic cat APOBEC3 variant confers resistance to feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 90, n. 1, p. 474–485, Oct 2016.

YU, X. *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 vif-cul5-scf complex. **Science**, New York, v. 1056, n., p. 3–82003, Nov 2003

ZHANG, H. *et al.* The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. **Nature**, London, v. 424, n. 6944, p. 94–98. Jul 2003.

ZHANG, W. *et al.* Distinct determinants in HIV-1 vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. **Plos One**, San Francisco, v. 3, n. 12, p. 66–72, Dec 2008.

ZHANG, Z., et al., Determinants of FIV and HIV Vif sensitivity of feline APOBEC3 restriction factors. **Retrovirology**. London, v. 13, n. 1, p. 1-23., July 2016.

ZHENG, Y.-H.; JEANG, K.-T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. **Retrovirology**, London, v. 9, n. 1, p. 112, Dec 2012.

ZIELONKA, J.; MÜNK C. Cellular restriction factors of feline immunodeficiency virus. **Viruses**, Basel, v. 3, p1986-2005, Oct 2011.

ZIELONKA, J. Dissertação. PhD. Universität Darmstadt. Inhibition of non primate lentiviruses by APOBEC3 cytidine deaminase. Darmstadt. 18 Jan. 2011