

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

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS INTRA-HOSPEDEIRO
E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS SANGUÍNEOS EM GATOS
INFECTADOS COM O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA**

PORTO ALEGRE

2023

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

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS INTRA-HOSPEDEIRO E
SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS SANGUÍNEOS EM GATOS INFECTADOS
COM O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA

Autora: Nicole Vieira Stone

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Microbiologia – Virologia

Orientadora: Prof. Dra. Ana Cláudia Franco

PORTO ALEGRE

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Stone, Nicole Vieira
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS
INTRA-HOSPEDEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM PAR METROS
SANGUÍNEOS EM GATOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA LEUCEMIA
FELINA / Nicole Vieira Stone. -- 2023.
50 f.
Orientador: 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, 2023.

1. Vírus da Leucemia Felina. 2. Haplótipos. 3.
Análise filogenética. 4. Parâmetros sanguíneos. 5.
Quasiespécies. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nicole Vieira Stone

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HAPLÓTIPOS INTRA-HOSPEDEIRO E
SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS SANGUÍNEOS EM GATOS INFECTADOS
COM O VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA

Aprovada em 30 de agosto de 2023.

APROVADA POR:

Prof. Dra. Ana Cláudia Franco

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Carolina Kist Traesel

Membro da Comissão

Dra. Caroline Tochetto

Membro da Comissão

Prof. Dra. Silvia de Oliveira Hübner

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o apoio, compreensão e incentivo. Devo tudo a vocês e sempre lembrarei disso. Amo muito vocês!

À minha namorada, por ser minha base, meu porto seguro no meio de todo o caos e sempre me incentivar a encarar tudo e seguir em frente. Te amo mais que tudo.

À minha sogra, que fez um papel impecável de conselheira e me deu os colos de mãe sempre que foi preciso.

À minha orientadora Ana Cláudia Franco pela oportunidade, ajuda, ensinamentos e por ser um exemplo pessoal e profissional.

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia, especialmente Bruna, Lina e Raíssa, e “as gurias da Frazzon”, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar, dividir a bancada, compartilhar um bolo ou tomar um cafézinho escutando meus desabafos, frustrações e felicidades. Todo esse período teria sido muito sem graça sem vocês.

Aos meus amigos que foram minha felicidade mesmo depois de dias de experimento, cansaço e frustrações. Amo vocês.

Aos meus colegas de artigo Lucía, Dennis e Martha, que estiveram ali mesmo com os imprevistos e as mudanças de planos, me acolhendo, ensinando e confortando. Obrigada!

À todos os professores da UNIPAMPA e UFRGS, que durante todos esses anos de virologia foram meus exemplos, me deram oportunidades e confiaram no meu trabalho. Serei eternamente grata e lembrarei de todos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação e realização deste estudo. Muito obrigada!

RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *Gammaretrovirus* que afeta felinos domésticos e selvagens. Sua replicação ocorre na medula óssea e em células linfoides, o que favorece infecções secundárias e reduz a expectativa de vida dos animais infectados. O curso clínico da doença pode ser abortivo, regressivo, progressivo ou focal, e é influenciado principalmente pelo sistema imune do animal infectado. Sendo um retrovírus, o FeLV apresenta uma elevada taxa de mutação, o que gera uma alta produção de variantes virais na população infectada. O sequenciamento de alto rendimento (HTS) pode ser usado para identificar e rastrear as variantes genéticas dentro de uma população viral ao longo do tempo. Compreender a diversidade genética intra-hospedeiro do FeLV é importante para entender a dinâmica evolutiva do vírus e seu impacto no desenvolvimento da doença. A análise filogenética do gene *env* surgiu como uma abordagem para a diferenciação das variantes do vírus, levando em conta diferenças genéticas em vez da apresentação clínica. Essas variantes, conhecidas como *quasispecies* ou haplótipos, são uma tentativa do vírus de obter vantagens adaptativas sob pressões seletivas. Neste estudo, o HTS foi usado para identificar haplótipos intra-hospedeiro e avaliar seu impacto nos parâmetros hematológicos em animais infectados pelo FeLV. Foram analisados eritrogramas e leucogramas de 18 gatos infectados por FeLV. O DNA total foi extraído de amostras de sangue, seguido de amplificação por PCR do gene *env* completo. Após a extração e purificação das bandas de aproximadamente 2,5 kb do gel de agarose, as amostras foram preparadas para HTS. As *reads* obtidas foram trimadas e alinhadas com a sequência de referência da região SU. Os haplótipos minoritários foram identificados usando o programa CliqueSNV. Eventos de recombinação foram detectados usando vários métodos, e uma árvore filogenética foi construída usando o programa IQ-TREE. Análises estatísticas foram realizadas para avaliar correlações e diferenças entre o número de haplótipos presentes em cada animal e as alterações sanguíneas encontradas. Nenhuma correlação significativa foi detectada entre a idade ou alterações sanguíneas de gatos FeLV-positivos e o número de *quasispecies* intra-hospedeiro. Ademais, não foi observada diferença significativa entre o número de haplótipos e a presença de anemia. No entanto, foi identificada uma diferença significativa no número de haplótipos entre gatos que apresentavam alteração nos testes hematológicos e aqueles que apresentavam valores dentro dos intervalos de referência.

Palavras-chave: Retrovírus felino. Hemograma. Análise filogenética. Variantes virais. *Quasispecies*

ABSTRACT

Feline leukemia virus (FeLV) is a Gammaretrovirus that affects domestic and wild cats. Its replication occurs in the bone marrow and lymphoid cells, which favors secondary infections and reduces the life expectancy of infected animals. The clinical course of the disease can be abortive, regressive, progressive or focal; and it is mainly influenced by the immune system of the infected animal. As a retrovirus, FeLV has a high mutation rate, which generates a high number of viral variants in the infected individual. High-throughput sequencing (HTS) can be used to identify and track genetic variants within a viral population over time. Understanding the intra-host genetic diversity of FeLV is important to comprehend the evolutionary dynamics of the virus and its impact on disease development. Phylogenetic analysis of the env gene has emerged as an approach to differentiate virus variants, taking into account factors other than clinical presentation. These variants, known as quasispecies, are an attempt by the virus to gain adaptive advantages under selective pressures. In this study, HTS was used to identify intra-host FeLV variants and assess their impact on hematological parameters in FeLV-infected animals. Erythro Grams and kilograms of 18 FeLV-infected cats were analyzed. Total DNA was extracted from blood samples using a standard protocol, followed by PCR amplification targeting the entire env gene. Gel bands of approximately 2.5 kb were extracted, purified and prepared for HTS. After quality checking, the obtained reads were trimmed and then aligned with the SU region reference sequence. Haplotypes were identified using CliqueSNV. Recombination events were detected using various methods, and a phylogenetic tree was constructed using IQ-TREE. Statistical analyzes were performed to evaluate correlations and differences between the number of haplotypes present in each animal and the blood alterations found. No significant correlation was detected between age or blood changes in FeLV-positive cats and the number of intra-host quasispecies. Furthermore, no significant difference was observed between the number of haplotypes and the presence of anemia. However, a statistical difference was identified when comparing the number of haplotypes between cats with altered blood count and those within the reference range.

Keywords: *Feline retrovirus. Erythrogram. Phylogenetic analysis. Viral variants. Quasispecies.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representando o genoma de FeLV integrado no DNA cromossomal do hospedeiro....17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i> (Vírus da Leucemia Bovina)
CA	<i>Capsid protein</i> (Proteína do capsídeo)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
enFeLV	<i>Endogenous Feline Leukemia Virus</i> (Vírus da Leucemia Felina endógeno)
FAIDS	<i>Feline Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
FeLV	<i>Feline Leukemia Virus</i> (Vírus da Leucemia Felina)
THRT1	<i>Human Thiamine Transport Protein 1</i>
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Felina)
FLVCR	<i>Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTS	<i>High-throughput sequencing</i>
IN	Integrase
KoRV	<i>Koala retrovirus</i> (Retrovírus de Coala)
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MA	<i>Matrix protein</i> (Proteína da matriz)
ML	<i>Maximum likelihood</i>
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i> (Vírus da Leucemia Murina)
NC	<i>Nucleocapsid protein</i> (Proteína do nucleocapsídeo)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PF	<i>Primer forward</i>
PR	<i>Primer reverse</i>
Pit1	<i>Phosphate transporter 1</i>
Pit2	<i>Phosphate transporter 2</i>
PRCA	<i>Pure red cell aplasia</i> (Aplasia pura de células vermelhas)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)

RT	<i>Reverse transcriptase</i> (Transcriptase reversa)
SU	<i>Surface protein</i> (Proteína de superfície)
TE	Tampão Tris-EDTA
TM	<i>Transmembrane protein</i> (Proteína transmembrana)
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

dl	Decilitro
°C	Grau Celsius
g	Gramma
=	Igual
<	Menor
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
%	Porcentagem
kb	Quilobase
U	Unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Retrovírus e características genômicas.....	16
2.2 Patogenia e imunologia.....	19
2.3 Sinais clínicos.....	20
2.4 Alterações hematológicas.....	21
2.5 Diagnóstico.....	22
2.6 Epidemiologia, Tratamento e Prevenção.....	23
2.7 Variação genômica.....	24
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina (FeLV) foi primeiramente descrito em 1964 (Jarrett *et al.*, 1964), se tornando um dos patógenos virais mais importantes em felinos descritos até hoje. É um retrovírus pertencente à subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Gammaretrovirus* e possui distribuição mundial, atingindo felinos domésticos e selvagens, sobretudo o gato doméstico (*Felis catus*) (Leutenegger *et al.*, 1999).

A replicação viral acontece principalmente em células da medula óssea e em células linfóides, resultando em uma doença imunossupressora e degenerativa. A imunossupressão causada favorece o desenvolvimento de infecções secundárias, o que pode contribuir para diminuir ainda mais a expectativa de vida dos animais infectados (Hartmann, 2012).

Além do vírus exógeno, existe ainda uma sequência de DNA no genoma dos felinos referente ao vírus da leucemia felina endógeno (enFeLV), o qual é transmitido apenas verticalmente, sem produção de vírus infeccioso (Roy-Burman, 1996). Apesar disso, a recombinação de um vírus endógeno com um exógeno pode gerar novas variantes do vírus, ocasionando uma alta diversidade genética (Coffin *et al.*, 2021; Overbaugh; Bangham, 2001).

A classificação dos subgrupos de FeLV tradicionalmente é feita através de testes de interferência viral (Sarma; Log, 1971). Dessa forma, a hipótese é de que cada subgrupo descrito (A, B, C, D, ERV-DC e T) utiliza um tipo específico de receptor celular, o que é determinado por pequenas variações no gene da proteína de superfície (SU). O FeLV-A é o único transmitido entre os animais e está presente em todos os gatos infectados. A recombinação de FeLV-A e enFeLV deu origem ao FeLV-B, associado principalmente ao desenvolvimento de neoplasias. O FeLV-C é pouco comum e é originado devido a uma mutação do FeLV-A. Esse vírus é detectado principalmente em animais com doença degenerativa severa. A recombinação de dois clones deu origem ao subgrupo FeLV-T, associado à casos de imunossupressão (FAIDS) (Hartmann, 2012; Miyazawa, 2002; Riedel *et al.*, 1986; Willett; Hosie, 2013). Uma proposta de classificação através da análise filogenética do gene *env* surgiu para contribuir com essa diferenciação (Cano-Ortiz *et al.*, 2022). Esse método de análise pode contribuir para o entendimento da evolução clínica da doença, sua distribuição geográfica e de resistência vacinal (Watanabe *et al.*, 2013).

Sequências de nucleotídeos diferentes, mas relacionados entre si, são denominadas “*quasispecies*”. Mutações, recombinações e rearranjos dos vírus de genoma RNA influenciam na capacidade desses vírus de evadir o sistema imune do hospedeiro ou até mesmo de ampliar o espectro de hospedeiros (Domingo; Sheldon; Perales, 2012). A detecção de diferentes variantes em um mesmo hospedeiro pode indicar infecções mistas, justificar quadros mais graves e influenciar na escolha do tratamento do animal (Houldcroft, Beale, Breuer, 2017). Apesar disso, alguns autores questionam a importância das *quasispecies* na apresentação clínica e epidemiológica da doença causada pelo FeLV (Holmes, 2010).

O curso clínico da doença pode ser classificado em quatro tipos: abortivo, focal, regressivo ou progressivo. A doença abortiva é encontrada em gatos imunocompetentes, na qual os animais possuem altos níveis de anticorpos neutralizantes para o vírus e o único sinal clínico encontrado é o aborto. Infecções focais ou atípicas são raras e nesse tipo de infecção o sistema imune consegue restringir a replicação viral em órgãos específicos (Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020). Gatos com a doença na forma regressiva possuem uma infecção transitória, e raramente apresentam sinais clínicos. Na FeLV regressiva a resposta imune ocorre de maneira parcialmente efetiva, inibindo a replicação do vírus após ele ter feito uma viremia primária. Dessa forma, o vírus fica em forma de provírus, podendo ser novamente reativado em situações de comprometimento do sistema imune. A doença progressiva é a forma mais grave da doença, com envolvimento da medula óssea e infecção de precursores de células vermelhas e leucócitos. Gatos com doença progressiva são os mais importantes disseminadores de FeLV e excretam grandes quantidades de vírus através da saliva. Os sinais clínicos desses animais variam e, dentre as quatro formas da doença, é a que possui o pior prognóstico.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Identificar *quasispecies* de FeLV em gatos domésticos infectados com diferentes apresentações hematológicas

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar, através do sequenciamento completo do gene *env*, a presença de *quasispecies* virais em gatos domésticos infectados e com diferentes apresentações clínicas
- Analisar a correlação entre os subgrupos virais, a diversidade de *quasispecies* e as alterações em parâmetros sanguíneos

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Retrovírus e características genômicas

Os retrovírus são vírus envelopados, de genoma diploide de RNA linear, fita simples e sentido positivo. A partícula viral tem de 80 a 100 nm de diâmetro e possui um envelope de composição lipídica. A família *Retroviridae* é ramificada em duas subfamílias, *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae* (Coffin *et al.*, 2021; ICTV, 2022). A subfamília *Orthoretrovirinae* é subdividida em seis diferentes gêneros (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Lentivirus*), enquanto os membros da subfamília *Spumavirinae* estão distribuídos em cinco gêneros (*Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus* e *Simiispumavirus*) (ICTV, 2022).

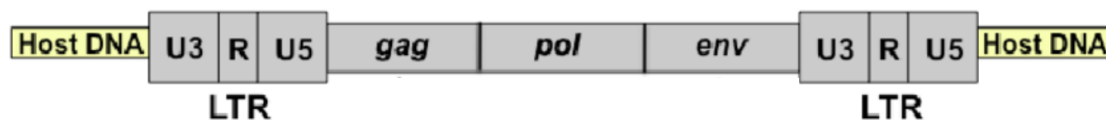
Existem dois retrovírus de importância em felinos, responsáveis pela maior parte das infecções virais em gatos domésticos, ambos pertencentes à subfamília *Orthoretrovirinae*. O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um *Lentivirus*, relatado em 1987 após ter sido isolado de gatos imunodeficientes (Pedersen *et al.*, 1987). A infecção por FIV é de baixa mortalidade, e a maioria dos animais adoecem e morrem em decorrência de infecções oportunistas devido à imunossupressão causada pelo vírus (Hartmann, 2012). A transmissão entre os animais ocorre majoritariamente pela saliva através de mordidas, ou então de forma vertical da mãe para a progênie (Kennedy; Little, 2016).

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *Gammaretrovirus*, descrito inicialmente em 1964 (Jarrett *et al.*, 1964). O patógeno possui distribuição mundial e infecta felinos domésticos e selvagens, sobretudo o gato doméstico (*Felis catus*) (Leutenegger *et al.*, 1999). O vírus infeccioso pode ser encontrado na saliva, sangue, fezes, urina e leite. A principal forma de transmissão ocorre através da saliva, tanto de forma direta como indireta, por meio de objetos contaminados e mordidas. Além disso, o vírus também pode ser transmitido verticalmente de mãe para os filhotes. Gatos machos não castrados são frequentemente afetados devido ao seu comportamento mais agressivo e às disputas territoriais. Por esse motivo, áreas com uma grande concentração de animais e gatos errantes são considerados como fatores de risco para a doença (Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020; Miyazawa, 2002).

Todos os retrovírus codificam os genes *gag*, *pol* e *env* (Krebs; Mendonça; Zhang, 2022). O gene *gag* é responsável pela codificação de proteínas estruturais, incluindo a proteína do capsídeo (CA), que é amplamente utilizada em testes de diagnóstico (Lutz *et al.*, 1983; Westman *et al.*, 2017). Além disso, o gene *gag* também codifica as proteínas do nucleocapsídeo (NC) e da matriz (MA). O gene *pol* codifica duas proteínas cruciais para a replicação viral, a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN). Por fim, o gene *env* codifica as proteínas de envelope, de superfície (SU) e transmembrana (TM), que desempenham um papel fundamental na determinação da composição fenotípica do envelope viral e, conseqüentemente, na afinidade pelos receptores celulares (Coffin *et al.*, 2021; Miyazawa, 2002). No genoma do FeLV foram identificadas pelo menos duas proteínas adicionais, denominadas Pro e GlycoGag. A proteína Pro contém um domínio de codificação para a protease viral (Johnson, 2019; Vogt, 1997). Já a proteína GlycoGag interage com fatores de restrição antiviral e pode afetar a infectividade das partículas virais (Ahi *et al.*, 2016; Cano-Ortiz *et al.*, 2022b).

O genoma de FeLV ainda codifica *long terminal repeats* (LTRs), que são constituídas por três regiões distintas: a região R, que está presente nas duas extremidades da fita de RNA, e as regiões U3 e U5, que são encontradas apenas em uma das extremidades da fita molde. Durante o processo de transcrição reversa, essas regiões U3 e U5 são duplicadas, resultando na geração de duas LTRs idênticas. Dessa forma, as LTRs são caracterizadas por essa estrutura simétrica composta por duas cópias das regiões U3, R e U5 (Benachenhou *et al.*, 2009; Johnson, 2019). O genoma viral, quando inserido na fita de DNA cromossomal, é denominado "provírus", cuja função é promover e regular a expressão viral a partir das LTRs (Greenwood *et al.*, 2018). Após sua inserção, o provírus passa a fazer parte do genoma da célula infectada do hospedeiro, tornando-o permanentemente infectado (Kvaratskhelia, 2014). O mecanismo de transcrição reversa, a falta de correção de erros da polimerase e a variação nas LTRs colaboram para a alta diversidade genética encontrada nos retrovírus (Coffin *et al.*, 2021).

Figura 1. Esquema representando o genoma de FeLV integrado no DNA cromossomal do hospedeiro.



Fonte: Adaptado de Bolin *et al.*, 2011.

Alguns gatos possuem sequências endógenas de FeLV (enFeLV), transmitidas de forma vertical e não infecciosa. Entre os FeLV exógenos, existem seis subgrupos: A, B, C, D, ERV-DC e T. O FeLV-A é a forma transmissível de FeLV, e está presente em todos os gatos infectados, sozinho ou em conjunto com outro subgrupo. O subgrupo A possui patogenicidade que varia de baixa a moderada, porém possui alta transmissibilidade. O FeLV-B é fruto de uma recombinação de FeLV-A e enFeLV, potencialmente tumorigênico e encontrado, na maioria das vezes, em gatos leucêmicos ou com linfoma. O FeLV-C é raro e ocorre devido a uma mutação no gene *env* do FeLV-A, detectado principalmente em animais com doença degenerativa severa e anemia não regenerativa devido a aplasia eritróide causada pelo vírus. A recombinação de dois clones distintos de FeLV-A (61C e 61E) deu origem ao subgrupo T. O FeLV-T possui afinidade por células T e está associado à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina (FAIDS) (Hartmann, 2012; Miyazawa, 2002; Riedel *et al.*, 1986; Willett; Hosie, 2013).

Cada subgrupo utiliza um tipo específico de receptor celular, determinado por pequenas variações na proteína SU. Os receptores Pit1 e Pit2, transportadores de fosfato, são utilizados pelo FeLV-B e FeLV-T, esse último se diferenciando pela necessidade de um co-receptor (FeLIX), uma proteína expressa majoritariamente em tecidos linfóides (Anderson *et al.*, 2001; Mendoza; Anderson; Overbaugh, 2006; Rudra-Ganguly; Gosh; Roy-Burman, 1998). O subgrupo C de FeLV se liga ao FLVCR, um receptor exportador de heme de dentro das células, necessário para o desenvolvimento das células eritroides (Philip *et al.*, 2015). Um transportador de tiamina (feTHRT1), expresso em vários órgãos e células linfóides, é utilizado como receptor do vírus FeLV-A e é correceptor dos demais subgrupos virais (Chiu, 2018; Mendoza; Anderson; Overbaugh, 2006).

A infecção do FeLV ocorre a partir da ligação das glicoproteínas de envelope do vírus com os receptores celulares do hospedeiro, numa junção proteína-receptor altamente específica. Após a entrada na célula, o RNA viral associado a uma transcriptase reversa é

transcrito em uma fita dupla de DNA, iniciando a replicação viral. Com o auxílio da integrase viral, a fita dupla de DNA é translocada ao núcleo e inserida no DNA cromossomal da célula hospedeira. Após a inserção do provírus, uma fita de RNA é transcrita e translocada para o citoplasma da célula hospedeira, onde vai ser traduzida, dando início a montagem da partícula viral e liberação através de brotamento (Coffin *et al.*, 2021).

2.2 Patogenia e imunologia

Após o contato de um animal suscetível com um animal infectado excretando o vírus, a replicação viral inicia na mucosa orofaríngea e, posteriormente, nos linfonodos adjacentes. A viremia primária acontece após a replicação local, quando as partículas virais são disseminadas através de linfócitos e monócitos infectados. Quando o sistema imune não é capaz de debelar a infecção, sucede a replicação viral na medula óssea, comprometendo os precursores de neutrófilos e plaquetas. Esse processo é chamado de viremia secundária. (Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020).

Além do *status* imunológico do animal, a evolução clínica da doença depende das características do vírus e da carga viral transmitida entre os animais (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Major *et al.*, 2010). O curso clínico da doença pode ser classificado em quatro tipos: abortivo, focal, regressivo ou progressivo. A doença abortiva ocorre em gatos imunocompetentes, cujo sistema imune elimina a infecção antes de atingir a viremia primária. Os animais com doença abortiva possuem altos níveis de anticorpos neutralizantes para o vírus, e o único sinal clínico encontrado é o aborto. Infecções focais ou atípicas são raras, nesse tipo de infecção o sistema imune consegue restringir a replicação viral em órgãos específicos como os linfonodos, glândulas mamárias e baço (Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020).

Gatos com a doença na forma regressiva desenvolvem uma infecção transitória, e raramente apresentam sinais clínicos. Na doença regressiva a resposta imune ocorre de maneira parcialmente efetiva, eliminando o vírus após ele ter feito uma viremia primária e antes de atingir a medula óssea, com imunidade gerada através de linfócitos T citotóxicos e anticorpos neutralizantes específicos para o vírus (Flynn *et al.*, 2000, 2002; Major *et al.*, 2010). Nesses casos, o vírus fica em estado “latente”, na forma de provírus, podendo reiniciar a infecção produtiva em situações que há comprometimento do sistema imune do

animal (Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020).

A doença progressiva é a forma mais grave da doença. Nesta, após a viremia primária, ocorre a viremia secundária e o vírus atinge a medula óssea, infectando precursores de eritrócitos e leucócitos. Gatos com doença progressiva são os mais importantes disseminadores de FeLV, pois secretam grandes quantidades de vírus através da saliva. Dentre as quatro formas da doença, a doença progressiva possui o pior prognóstico (Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020). Gatos com infecção progressiva não possuem linfócitos T citotóxicos ou anticorpos neutralizantes capazes de debelar a infecção, provavelmente por depleção das células precursoras de linfócitos na medula óssea (Flynn *et al.*, 2000, 2002).

2.3 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da infecção pelo FeLV estão relacionadas com a destruição das células e tecidos em que o vírus replica e com os efeitos oncogênicos observados em células do sistema imunológico. Com exceção dos lentivírus, spumavírus e alguns deltaretrovírus, os retrovírus têm a capacidade oncogênica. Isso ocorre devido à sua integração e replicação próxima a um oncogene celular, o que pode resultar na ativação e superexpressão desse gene. Essa interação entre o retrovírus e o oncogene celular pode levar à perda do controle da divisão celular e produção de tumores (Coffin *et al.*, 2021; Maeda; Fan; Yoshikai, 2008). As principais neoplasias desenvolvidas após a infecção são o linfoma e a leucemia (Hartmann, 2012; Pare; Ellis; Juette, 2022). A compressão nos órgãos do sistema nervoso central ocasionada pelo linfoma ou infiltrados linfocitários pode ser uma das causas do aparecimento de sinais neurológicos encontrados na doença, como alterações na vocalização. Ademais, os animais infectados podem apresentar aumento dos linfonodos em várias partes do corpo devido à reação do sistema imunológico à infecção (Hartmann, 2012; Rungsuriyawiboon *et al.*, 2022).

FeLV também está associado à destruição celular em diversos tecidos como medula óssea e sistema imune (causando anemia, neutropenia, trombocitopenia, depleção de linfócitos T, atrofia linfoide, hiperplasia linfoide), epitélio do trato gastrointestinal e tecido glandular (Greggs *et al.*, 2011). A imunossupressão gerada pela

replicação do vírus em células do sistema imune está associada a sinais clínicos muito variáveis, relacionados a diferentes infecções oportunistas que podem vir a causar gengivostomatite, infecções respiratórias, gastrointestinais e cutâneas. Como as infecções por FeLV são frequentemente crônicas em gatos, o animal infectado poderá apresentar diferentes infecções oportunistas e perda de peso progressiva ao longo da vida. Sinais clínicos adicionais geralmente incluem dispneia, letargia, anorexia, perda de peso, febre, gengivite/estomatite e abscessos que não cicatrizam (Greggs *et al.*, 2011; Hartmann, 2012; Hofmann-Lehmann; Hartmann, 2020; Rungsuriyawiboon *et al.*, 2022)

2.4 Alterações hematológicas

A infecção por FeLV está associada a diferentes tipos de alterações leucocitárias, as quais são encontradas frequentemente em gatos com doença progressiva e raramente em animais com doença regressiva (Biezus *et al.*, 2023; Stützer *et al.*, 2010). Tais alterações são causadas pela replicação viral na medula óssea e consequente supressão medular. Assim, FeLV pode ser uma causa primária de linfoma, leucemia e mielodisplasia (pré-leucemia). Os linfomas associados a esse vírus frequentemente se originam de linfócitos T, enquanto que as leucemias podem ser de vários tipos: leucemia linfóide aguda, leucemia não linfóide mieloide, eritroide ou megacariocítica. Como consequência, são muito frequentemente observadas alterações na contagem de leucócitos, como leucocitose (aumento do número de leucócitos), leucopenia (diminuição do número de leucócitos) ou presença de células imaturas na corrente sanguínea (Pare; Ellis; Jutte, 2022). Além da leucemia, os animais podem desenvolver outros distúrbios hematológicos, como anemia (redução da concentração de hemoglobina causada por ausência ou perda de função das hemácias) e trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas no sangue) (Hartmann, 2012). Com relação a eritrócitos, várias alterações são observadas em animais com doença progressiva. Pode haver redução do hematócrito e anemia não regenerativa, a qual é um achado importante em gatos infectados com FeLV. Tais alterações ocorrem pela ação direta do vírus nos precursores hematopoiéticos (Abkowitz *et al.*, 1987; Onions *et al.*, 1982; Testa *et al.*, 1983). Além disso, uma apresentação recorrente de anemia em animais infectados por FeLV é a aplasia pura de células vermelhas (PRCA), caracterizada por uma disfunção dos precursores dos glóbulos vermelhos (Winzelberg; Hohenhaus, 2019).

O aumento na produção de eritrócitos e a presença de formas imaturas são indicativos de uma anemia regenerativa, encontrada com menos frequência em gatos infectados por FeLV. Diferente da forma não regenerativa, nesse caso há o aumento da concentração de reticulócitos, o que pode indicar uma recuperação funcional da medula óssea (Thrall, 2017a). Em outros casos, a diminuição na contagem de reticulócitos também pode ocorrer e está relacionada a uma eritropoiese (produção e maturação das hemácias) ineficiente, ocasionada pelo dano medular primário causado pelo vírus (Thrall, 2017b).

2.5 Diagnóstico

Diferentes testes ou combinações de testes laboratoriais são utilizados para diagnosticar as quatro formas da infecção. As técnicas de detecção de antígeno viral são amplamente utilizadas para o diagnóstico de FeLV e são úteis para o acompanhamento da progressão da doença. Esses testes fazem a detecção da proteína p27 presente no capsídeo viral (Westman; Malik; Norris, 2019). Com esse objetivo, a imunocromatografia de fluxo lateral (teste rápido) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os métodos mais utilizados e estão amplamente difundidos (Little *et al.*, 2020; Westman *et al.*, 2017). Ambas as técnicas são altamente específicas na presença de viremia. A imunofluorescência e o isolamento viral são métodos pouco utilizados devido à complexidade e demora na obtenção dos resultados, além das baixas porcentagens de especificidade e sensibilidade quando comparadas aos outros testes disponíveis (Lutz *et al.*, 2009).

Os testes rápidos, apesar de serem eficientes para confirmar ou descartar uma infecção por FeLV, não detectam infecções abortivas, focais ou regressivas (Westman *et al.*, 2017). Nesses casos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada para detectar provírus em animais infectados, confirmando a infecção na ausência de antigenemia (Tandon *et al.*, 2005).

A caracterização do tipo de infecção ocorre após a realização de testes seriados intervalados, através da detecção do antígeno ou DNA proviral, nos quais animais com doença progressiva apresentam resultado positivo para ambos os testes. Gatos com doença regressiva serão positivos para o antígeno apenas na fase aguda da doença, mas terão DNA proviral detectado em qualquer circunstância. A doença em sua forma abortiva é a única em que não se tem a detecção nem de RNA viral, nem de DNA proviral, e sua única forma de

identificação é através da detecção de anticorpos neutralizantes antivirais (Hartmann, 2012).

2.6 Epidemiologia, Tratamento e Prevenção

A prevalência da doença varia de acordo com a localização geográfica e as características populacionais dos gatos. Ambientes com maior densidade de animais estão mais propensos a ter uma maior disseminação do vírus do que aqueles com um único animal.

Até o momento não foi estabelecido um tratamento específico e totalmente eficaz para animais infectados pelo FeLV. Alguns antirretrovirais utilizados em outras infecções retrovirais vêm sendo testados *in vitro* e *in vivo*. A Zalcitabina, também conhecida como ddC, é um inibidor da transcriptase reversa utilizado no tratamento do HIV e possui eficácia comprovada *in vitro* contra FeLV, porém *in vivo* o fármaco possui baixa eficiência e potencial tóxico (Hartmann, 2015; Zeidner *et al.*, 1989). O Raltegravir possui atividade inibidora da integrase e é o fármaco mais utilizado para tratamento da doença. Além da eficácia e segurança em estudos *in vitro*, o medicamento mostrou potencial de diminuição da viremia durante o período de tratamento (Boesch *et al.*, 2015; Cattori *et al.*, 2011). Os interferons também são alvos de estudo e possíveis adjuvantes no tratamento da doença (Gomez-Lucia *et al.*, 2020; Hoover *et al.*, 1990; Jameson; Essex, 1983). Entretanto, nenhum protocolo específico e comprovadamente eficaz *in vivo* foi estabelecido oficialmente até o momento.

Animais com doença secundária associada à FeLV devem receber tratamento de suporte, como transfusões sanguíneas em caso de desordens hematológicas e tratamento quimioterápico caso haja a presença de tumores. O uso de medicamentos imunossupressores deve ser evitado, tendo em vista que os animais já se encontram imunossuprimidos (Javinsky, 2016).

A melhor forma de prevenir a disseminação do vírus é por meio da vacinação dos animais suscetíveis e do diagnóstico precoce da doença, a fim de isolar os animais positivos. Duas tecnologias de vacinas não replicantes são usualmente utilizadas para FeLV: a recombinante vetorial e a inativada. Algumas pesquisas indicam que a vacina inativada apresenta uma eficácia superior na prevenção da doença, inclusive a longo prazo (Jirjis *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2010).

Embora a vacina inativada seja destacada pela sua eficácia, ambas as vacinas são

aprovadas e seguras para uso. O processo de vacinação deve ser iniciado a partir da oitava semana de vida dos animais, seguindo um esquema de administração de duas doses iniciais intervaladas de três a quatro semanas entre si. Após as doses iniciais, é recomendado um reforço vacinal a cada 12 meses para gatos com alto risco de exposição ao vírus, e a cada 24 meses para gatos acima de três anos de idade e em baixo risco. Apesar da maioria dos testes diagnósticos não conseguirem detectar anticorpos originados pela vacinação, é recomendável realizar uma avaliação prévia antes da imunização, visto que a vacina não apresenta eficácia em gatos que já estejam infectados pelo vírus (Scherk *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2020). Além da vacinação, a aplicação de testes de diagnóstico nas populações auxilia no controle da doença, uma vez que permite a identificação precoce de casos e na implementação de medidas preventivas para reduzir a propagação do vírus (Lutz *et al.*, 2009).

2.7 Variação genômica

A alta taxa de mutação observada entre os retrovírus origina populações de genomas intimamente relacionados, conhecidas como *quasispecies* virais ou haplótipos. Essa produção de variantes virais, que ocorre já dentro de um mesmo hospedeiro (chamados de variantes intra-hospedeiro), pode facilitar o surgimento de vírus que se adaptam à pressão seletiva produzida por uso de medicamentos antirretrovirais ou pela resposta imune antiviral (Domingo; Sheldon; Perales, 2012). Determinar a diversidade genética de um vírus (ou seja, inferir haplótipos e suas proporções na população) é importante para entender os seus padrões de mutação, contribuindo para o desenvolvimento eficaz de tratamentos e/ou vacinas. Ainda, a detecção de diferentes variantes em um mesmo hospedeiro pode indicar infecções mistas, justificar o desenvolvimento de quadros mais graves e influenciar na escolha do tratamento do animal (Houldcroft, Beale, Breuer, 2017).

No âmbito dos retrovírus, o estudo de *quasispecies* tem sido utilizado como uma abordagem para detectar regiões genéticas estáveis e avaliar possíveis novos alvos para o desenvolvimento de vacinas (Ishida *et al.*, 2015). Além disso, a identificação e caracterização de *quasispecies* podem ser aplicadas para detectar similaridades entre retrovírus infectando diferentes espécies, permitindo a determinação de fatores de risco, avaliação de possíveis

transbordamentos da barreira interespécies e auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção e controle de doenças (Corredor-Figueroa *et al.*, 2021).

O gene *env* dos retrovírus é um dos principais alvos do estudo de diversidade genômica, isso porque ele é responsável pela codificação de elementos essenciais na formação do envelope viral e na interação do vírus com os receptores celulares (Coffin *et al.*, 2021; Miyazawa, 2002). Os subgrupos de FeLV são diferenciados por mutações e recombinações no gene *env*, onde pequenas variações na proteína de superfície (SU) ajudam a determinar o tipo de receptor utilizado por cada subgrupo (Anderson *et al.*, 2001; Mendoza; Anderson; Overbaugh, 2006; Rudra-Ganguly; Gosh; Roy-Burman, 1998).

A caracterização dos subgrupos de FeLV foi estabelecida utilizando testes de interferência viral (Sarma; Log, 1971). Entretanto, com o aumento do uso de sequenciamento de alto rendimento (HTS), a análise filogenética vem ganhando lugar na caracterização e classificação desses vírus, incluindo a análise completa do gene *env* (Cano-Ortiz *et al.*, 2022a; Chiu, 2018). Ainda assim, os estudos que visam a descrição de variantes de FeLV são ainda muito limitados.

Foi sugerido que exista uma associação entre o perfil intra-hospedeiro de *quasispecies* de retrovírus com o tipo ou gravidade do quadro clínico apresentado. Um estudo prévio com FIV demonstrou que gatos sem sinais clínicos aparentes apresentaram maior diversidade no gene *env* do que aqueles com doença clínica (Bęczkowski *et al.*, 2015). Entretanto, estudos sobre a relação de *quasispecies* de FeLV com a apresentação clínica da doença não existem, e alguns autores questionam a importância do perfil de *quasispecies* na evolução da infecção (Holmes, 2010).

Diante desses pontos, este trabalho teve como objetivo avaliar a possível interferência das *quasispecies* intra-hospedeiro nas alterações hematológicas em gatos positivos para o vírus. Essa investigação pode fornecer informações importantes sobre como as *quasispecies* podem afetar a apresentação da doença e como isso pode se manifestar em termos de mudanças nos parâmetros hematológicos. Compreender melhor essas interações pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias de manejo e tratamento de gatos infectados, bem como para o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos e vacinas com maior eficácia.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O material e métodos, resultados e discussão que compõem esta dissertação são apresentados a seguir na forma de artigo científico e é intitulado “*Intra-host variants in FeLV-infected animals*”.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo identificar *quasispecies* de FeLV em gatos domésticos infectados e tentar estabelecer uma correlação entre o perfil de *quasispecies* virais intra-hospedeiro e alterações nos parâmetros sanguíneos desses animais. Não foi observada, neste estudo, uma correlação entre o número de haplótipos de FeLV identificados em cada animal e os parâmetros sanguíneos, quando estes foram analisados separadamente. Também não foi possível encontrar uma correlação entre a idade do animal infectado e o número de *quasispecies* circulantes. No entanto, quando os animais foram separados em dois grupos, um com pelo menos uma alteração nos parâmetros sanguíneos e o outro sem nenhuma alteração, foi observada a presença de um maior número de *quasispecies* virais nos animais com ao menos uma alteração sanguínea.

Este é o primeiro trabalho que se dedica a analisar a presença de variantes de FeLV em gatos infectados, relacionando-os com os parâmetros sanguíneos apresentados. A falta de correlação entre os dados analisados neste estudo pode ser devido à ampla gama de alterações sanguíneas observadas em diferentes animais e/ou ao número de animais analisados (n=18). Sendo assim, é possível que a ampliação do número de animais testados traga mais informações a respeito deste importante aspecto da patogenia da doença causada por FeLV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABKOWITZ, J. L.; HOLLY, R. D.; GRANT, C. K. Retrovirus-induced Feline Pure Red Cell Aplasia Are Uniquely Sensitive to Heterologous Complement. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 4, p. 1056–1063, 1987.
- AHI, Y. S. *et al.* Functional Interplay Between Murine Leukemia Virus Glycogag, Serinc5, and Surface Glycoprotein Governs Virus Entry, with Opposite Effects on Gammaretroviral and Ebolavirus Glycoproteins. **mBio**, v. 7, n. 6, 2016.
- ANDERSON, M. *et al.* Feline Pit2 Functions as a Receptor for Subgroup B Feline Leukemia Viruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10563-10572, 2001.
- BĘCZKOWSKI, P. M. *et al.* Rapid evolution of the env gene leader sequence in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 4, p. 893–903, 2015.
- BENACHENHOU, F. *et al.* Evolutionary Conservation of Orthoretroviral Long Terminal Repeats (LTRs) and *ab initio* Detection of Single LTRs in Genomic Data. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. 1-16, 2009.
- BIEZUS, G. *et al.* Progressive and regressive infection with feline leukemia virus (FeLV) in cats in southern Brazil: Prevalence, risk factors associated, clinical and hematologic alterations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 216, 2023.
- BOESCH, A. *et al.* Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress™) on the course of progressive feline leukemia virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 2-4, p. 167-178, 2015.
- BOLIN, L. L.; LEVY, L. S. Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1681-1698, 2011.
- CANO-ORTIZ, L. *et al.* Could Phylogenetic Analysis Be Used for Feline Leukemia Virus (FeLV) Classification? **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 249, 2022a.
- CANO-ORTIZ, L. *et al.* Feline Leukemia Virus-B Envelope Together With its GlycoGag and Human Immunodeficiency Virus-1 Nef Mediate Resistance to Feline SERINC5. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, v. 6, 2022b.
- CATTORI, V.; WEIBEL, B.; LUTZ, H. Inhibition of Feline leukemia virus replication by the integrase inhibitor Raltegravir. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 165-168, 2011.
- CHIU, E. S. A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. **Viruses**, v. 10, n. 29, p. 1-12, 2018.
- COFFIN, J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. **Journal Of General Virology**, v. 102, n. 12, p. 1-2, 2021
- CORREDOR-FIGUEROA, A. P. *et al.* Co-Circulation of Bovine Leukemia Virus Haplotypes

among Humans, Animals, and Food Products: New Insights of Its Zoonotic Potential.

International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 18, n. 9, 2021

DOMINGO, E., SHELDON, J. PERALES, C. Viral Quasispecies Evolution. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159-216, 2012.

FLYNN, J. N.; HANLON, L.; JARRETT, O. Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. **Immunology**, v. 101, n. 1, p. 120-125, 2000.

FLYNN, J. N. *et al.* Longitudinal Analysis of Feline Leukemia Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes: Correlation with Recovery from Infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 5, p. 2306-2315, 2002.

GOMEZ-LUCIA, E. *et al.* Clinical and Hematological Follow-Up of Long-Term Oral Therapy with Type-I Interferon in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus or Feline Immunodeficiency Virus. **Animals**, v. 10, n. 9, 2020.

GREENWOOD, A. D. *et al.* Transmission, Evolution, and Endogenization: Lessons Learned from Recent Retroviral Invasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 1, 2018.

GREGGS, W. M. *et al.* Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 7, p. 115–122, 2011.

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

HARTMANN, K. Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats: What does the current literature tell us? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 11, p. 925-939, 2015.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HARTMANN, K. Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 9, p. 831–846, 2020.

HOFMANN-LEHMANN, R. *et al.* How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1, p. 119-123, 2008.

HOLMES, E. C. The RNA virus quasispecies: fact or fiction?. **Journal Of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p 271–273, 2010.

HOOVER, E. A. *et al.* Therapy of Presymptomatic FeLV-Induced Immunodeficiency Syndrome with AZT in Combination with Alpha Interferon. **Annals New York Academy Of Sciences**, v. 616, p. 258-269, 1990.

HOULDCROFT, C. J., BEALE, M. A., BREUER, J. Clinical and biological insights from

viral genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 183–192, 2017.

ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*). **Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021**. Disponível

em: <<https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae>>. Acesso em: 05 jul. 2023.

ISHIDA Y. *et al.* Sequence variation of koala retrovirus transmembrane protein p15E among koalas from different geographic regions. **Virology**, v. 475, p. 28–36, 2015.

JAMESON, P.; ESSEX, M. Inhibition of feline leukemia virus replication by human leukocyte interferon. **Antiviral Research**, v. 3, n. 2, p. 115-120, 1983.

JARRETT, W. F. H. *et al.* A Virus-like Particle associated with Leukaemia (Lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, n. 4932, p. 567–568, 1964.

JAVINSKY, E. Hematologia e Distúrbios Imunorrelacionados. *In*: LITTLE, S. E. **O Gato - Medicina Interna**, 1ª edição, Rio de Janeiro, Grupo GEN, 2016, cap. 25, p. 619-677.

JIRJIS, F. F. *et al.* Protection against feline leukemia virus challenge for at least 2 years after vaccination with an inactivated feline leukemia virus vaccine. **Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine**, v. 11, n. 2, p. 1–6, 2010.

JOHNSON, W. E. Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 355-370, 2019.

KENNEDY, M., LITTLE, S. E. Doenças Infecciosas - Doenças Virais. *In*: LITTLE, S. E. **O Gato - Medicina Interna**, 1ª edição, Rio de Janeiro, Grupo GEN, 2016, cap. 33, p. 978-1046.

KREBS, A; MENDONÇA, L. M.; ZHANG, P. Structural Analysis of Retrovirus Assembly and Maturation. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2022.

KVARATSKHELIA, M *et al.* Molecular mechanisms of retroviral integration site selection. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 16, p. 10209-10225, 2014.

LEUTENEGGER, C. M. *et al.* Viral infections in free-living populations of the European wildcat. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 678–686, 1999.

LITTLE, S. *et al.* 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.

LUTZ, H *et al.* Feline Leukaemia: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 565-574, 2009.

LUTZ, H. *et al.* Monoclonal Antibodies to Three Epitopic Regions of Feline Leukemia Virus p27 and their use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of p27. **Journal Of Immunological Methods**, v. 56, n. 2, p. 209-220, 1983.

- MAEDA, Y., FAN, H., YOSHIKAI, Y. Oncogenesis by retroviruses: Old and new paradigms. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 6, p. 387-405, 2008.
- MAJOR, A. *et al.* Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. **Veterinary Research**, v. 41, n. 17, 2010.
- MENDOZA, R., ANDERSON, M., OVERBAUGH, J. A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3378-3385, 2006.
- MIYAZAWA, T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology**, p. 504–518, 2002.
- ONIONS, D. *et al.* Selective effect of feline leukaemia virus on early erythroid precursors. **Nature**, v. 296, p. 156–158, 1982.
- OVERBAUGH, J., BANGHAM, C. R. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**. v. 292, n. 5519, p. 1106-1109, 2001.
- PARE, A., ELLIS, A., JUETTE, T. Clinicopathological findings of FeLV- positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008–2019). **PLoS ONE**, v. 17, n. 4, 2022.
- PATEL, M. *et al.* Comparative Efficacy of Feline Leukemia Virus (FeLV) Inactivated Whole-Virus Vaccine and Canarypox Virus-Vectored Vaccine during Virulent FeLV Challenge and Immunosuppression. **Clinical and vaccine immunology**, v. 22, n. 7, p. 798–805, 2015.
- PEDERSEN, N. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 4790, p. 790–793, 1987.
- PHILIP, M. *et al.* Heme Exporter FLVCR Is Required for T Cell Development and Peripheral Survival. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 4, p. 1677-1685, 2015.
- RIEDEL, N. *et al.* Molecular analysis and pathogenesis of the feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-Sarcoma. **Journal of Virology**, v. 60, n. 1, p. 242–250, 1986.
- ROY-BURMAN, P. Endogenous env Elements: Partners in Generation of Pathogenic Feline Leukemia Viruses. **Virus Genes**, v. 11, n. 2-3, p. 147-161, 1996.
- RUDRA-GANGULY, N.; GOSH, A. K.; ROY-BURMAN, P. Retrovirus receptor PiT-1 of the *Felis catus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1443, n. 3, p. 407-413, 1998.
- RUNGSURIYAWIBOON, O. *et al.* Risk factors and clinical and laboratory findings associated with feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in Bangkok, Thailand. **Veterinary World**, v. 15, n. 7, p. 1601-1609, 2022.
- SARMA, P. S., LOG, T. Viral interference in feline leukemia-sarcoma complex. **Virology**, v. 44, n. 2, p. 352-358, 1971.

SCHERK, M. A. *et al.* 2013 AAHP Feline Vaccination Advisory Panel Report. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 9, p. 785-808, 2013.

STONE, A. E. *et al.* 2020 AAHA/AAFP Feline Vaccination Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 9, p. 813–830, 2020.

STÜTZER, B. *et al.* Role of Latent Feline Leukemia Virus Infection in Nonregenerative Cytopenias of Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 192-197, 2010.

TANDON, R. *et al.* Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 130, n. 1-2, p. 124-132, 2005.

TESTA, O. *et al.* Haemopoietic colony formation (BFU-E, GM-CFC) during the development of pure red cell hypoplasia induced in the cat by feline leukaemia virus. **Leukemia Research**, v. 7, n. 2, p. 103-116, 1983.

THRALL, M. A. Anemia regenerativa. In: THRALL, M. A *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro, Editora Roca LTDA, 2017a, cap. 8, p. 74-96.

THRALL, M. A. Anemia não regenerativa. In: THRALL, M. A *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Roca LTDA, 2017b, cap. 7, p. 69-74.

TORRES, A. N. *et al.* Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, n. 1-2, p. 122–131, 2010.

VOGT, P. K. The place of retroviruses in biology. **Retroviruses**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p. 1-4.

WATANABE, S. *et al.* Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013.

WESTMAN, M. E. *et al.* Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, v. 50, p. 88-96, 2017.

WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; NORRIS, J. M. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. **Australian Veterinary Journal**, v. 97, n. 3, p. 47-55, 2019.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukemia virus: Half a century since its discovery. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 16–23, 2013.

WINZELBERG, S. O.; HOHENHAUS, A. E. Feline non-regenerative anemia: Diagnostic

and treatment recommendations. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, n. 7, p. 615-631, 2019.

ZEIDNER, N. S. *et al.* Treatment of FeLV-induced immunodeficiency syndrome (FeLV-FAIDS) with controlled release capsular implantation of 2',3'-dideoxycytidine. **Antiviral research**, v. 11, n. 3, p. 147–160, 1989.