



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SUBTIPIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM
PORTUGAL CONTINENTAL E AÇORES

Inês Pereira Marques Leal

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SUBTIPIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM
PORTUGAL CONTINENTAL E AÇORES

Inês Pereira Marques Leal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2015

LISBOA

Ao meu sobrinho, Gustavo

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha sincera gratidão a todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

À minha orientadora, Doutora Ana Duarte, pela simpatia, receptividade, sugestão do tema, orientação, incentivo e, acima de tudo, pela paciência.

Ao professor Telmo Nunes por me ter reintroduzido à área de epidemiologia num pré-estágio e pelo positivismo sempre transmitido.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa pela cedência das amostras e pelo apoio financeiro que permitiu a realização da componente laboratorial deste projeto.

Ao João Cota e à Carolina Bento pelo acompanhamento e ajuda na execução de técnicas laboratoriais durante o período de estágio.

Ao meu Canhinha pelo conhecimento transmitido e por me acompanhar sempre. Sem ti tinha sido bem mais difícil.

Aos pais da Di e à Di por me terem “adotado” e proporcionado as melhores condições para a finalização desta dissertação.

À João e à Flávia pelo apoio incondicional.

À minha mãe por me ouvir sempre.

Ao meu pai. Por tudo.

RESUMO

SUBTIPIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM PORTUGAL CONTINENTAL E AÇORES

Objetivo: Determinar a diversidade genética do vírus da imunodeficiência felina (FIV) numa amostra populacional de felinos seropositivos de Portugal Continental e Açores.

Métodos: O DNA proviral de 82 amostras de sangue total de felinos seropositivos foi isolado e posteriormente amplificado um fragmento correspondente aos domínios mais variáveis do gene *env* (V3-V5), pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). A amplificação foi confirmada pela visualização do fragmento em géis de eletroforese. Os produtos purificados foram diretamente sequenciados. Foi realizada uma análise filogenética, comparando as novas sequências obtidas com sequências representativas dos diferentes subtipos.

Resultados: A região V3-V5 foi amplificada e sequenciada com sucesso em 49 amostras, das quais 31 agruparam no subtipo B, 11 no subtipo A, 6 no subtipo E e 1 no subtipo F.

Conclusão: O subtipo B é o mais comum em Portugal e o único detetado nos Açores. A diversidade genética entre subtipos e dentro do subtipo B é crescente. Este é o primeiro estudo que relata a presença do subtipo E no país. Estudos posteriores noutros centros urbanos e ilhas poderão fornecer mais informação útil sobre a diversidade filogenética de FIV em Portugal.

Palavras-chave: análise filogenética, Açores, diversidade genética, felinos, Portugal Continental, vírus da imunodeficiência felina, subtipificação molecular, subtipos.

Abreviaturas: FIV, vírus da imunodeficiência felina; PCR, reação em cadeia pela polimerase.

ABSTRACT

MOLECULAR SUBTYPING OF THE FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN CONTINENTAL PORTUGAL AND AZORES

Objective: To determine the genetic diversity of feline immunodeficiency virus (FIV) in a sample of FIV-positive cats in mainland Portugal and Azores.

Methods: Proviral DNA was isolated from 82 samples and subsequently amplified by polymerase chain reaction (PCR) to yield a fragment corresponding to the high variable regions of the *env* gene (V3-V5). Amplification was confirmed by the fragment visualization in electrophoresis gels. The purified products were directly sequenced. Phylogenetic analysis was performed and comparisons made with previously characterized sequences of the different subtypes.

Results: The V3-V5 region was successfully amplified in 49 samples. The new sequences were found to cluster in 4 subtypes: 31 samples clustered with subtype B sequences, 11 with subtype A, 6 with subtype E and 1 with subtype F.

Conclusions: Subtype B is the most common in Portugal and the only one detected in Azores. Genetic diversity between subtypes and within the subtype B is increasing. This is the first study that reports the presence of subtype E in Portugal. Further studies in other urban centers and islands may provide more useful information about the phylogenetic diversity of FIV in Portugal.

Keywords: Azores, cats, feline immunodeficiency virus, genetic diversity, mainland Portugal, molecular subtyping, phylogenetic analysis, subtypes.

Abbreviations: FIV, feline immunodeficiency virus; PCR, polymerase chain reaction.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Temática e objetivos	1
2. Breve descrição do estágio curricular	2
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Imunodeficiência felina.....	4
1.1. Etiologia	4
1.1.1. Estrutura e organização genómica do virião.....	4
1.2. Epidemiologia	8
1.2.1. Epidemiologia molecular e subtipificação viral	8
1.2.2. Distribuição e prevalência	11
1.2.3. Modo de transmissão	13
1.3. Patogenia da infeção e apresentação clínica.....	14
1.4. Diagnóstico laboratorial	17
1.4.1. Detecção de Anticorpo	18
1.4.1.1. ELISA	18
1.4.1.2. Imunocromatografia de membrana.....	19
1.4.1.3. Imunofluorescência indireta	20
1.4.1.4. Western Blot	21
1.4.2. Detecção de Antigénio	21
1.4.2.1. Isolamento viral	21
1.4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	21
1.5. Tratamento	22
1.6. Vacinação	24
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1. Amostra populacional em estudo.....	26

2. Processamento das amostras.....	27
2.1. Extração e purificação de DNA total.....	27
2.2. Avaliação da pureza das amostras.....	27
2.3. Detecção de DNA proviral e amplificação da região V3-V5 do gene <i>env</i> , através de <i>Nested-PCR</i>	27
2.4. Eletroforese em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado.....	30
2.5. Extração e purificação de DNA a partir de géis de agarose.....	32
2.6. Sequenciação e análise filogenética.....	32
IV. RESULTADOS.....	34
1. Amplificação da V3-V5 do gene <i>env</i>	34
2. Sequenciação e análise filogenética.....	35
V. DISCUSSÃO.....	47
VI. CONCLUSÃO.....	51
VII. BIBLIOGRAFIA.....	52
ANEXO 1 – Quantificação do DNA genómico das amostras em estudo.....	66
ANEXO 2 – Alinhamento.....	67
ANEXO 3 – Códigos de identificação das sequências já caracterizadas e subtipificadas.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da estrutura de um virião do FIV	5
Figura 2 – Esquema representativo da organização genómica do FIV	6
Figura 3 – Diagrama representativo dos 9 domínios variáveis do gene <i>env</i>	9
Figura 4 – Percentagem de alterações nucleotídicas em função dos domínios e regiões variáveis do gene <i>env</i>	9
Figura 5 – Evolução temporal da infecção por FIV	16
Figura 6 – Estomatite num gato infetado por FIV	16
Figura 7 – Esquema representativo da interpretação de um teste SNAP Combo Plus	20
Figura 8 – Esquema representativo de um <i>Nested-PCR</i>	28
Figura 9 – Marcador de pesos moleculares utilizado nas corridas de eletroforese	31
Figura 10 – Esquema representativo das etapas que se seguem à visualização do gel de eletroforese, consoante o tipo de banda identificada	31
Figura 11 – Visualização de géis de eletroforese no transiluminador	34
Figura 12 – Gráfico representativo da amostra populacional em estudo	35
Figura 13 – Árvore filogenética <i>Neighbor-Joining</i> , evidenciando os subtipos e subgrupos B identificados	36
Figura 14 – Gráfico representativo das percentagens de novas sequências em cada subtipo..	38
Figura 15 – Ampliação da árvore <i>Neighbor-Joining</i> , pormenor do subtipo B	39
Figura 16 – Alinhamento das sequências nucleotídicas (550 bp) dos Açores que formam aglomerados no subgrupo B1	41
Figura 17 – Ampliação da árvore <i>Neighbor-Joining</i> , pormenor do subtipo A	42
Figura 18 – Alinhamento das sequências nucleotídicas (550 bp) da UZL que formam aglomerados no subtipo A	43
Figura 19 – Ampliação da árvore <i>Neighbor-Joining</i> , pormenor do subtipo E	45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição mundial dos subtipos do FIV	11
Tabela 2 – Origem e identificação das amostras	26
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados no <i>Nested-PCR</i>	29
Tabela 4 – Programa de amplificação do termociclador para as duas rondas de PCR	30
Tabela 5 – Distâncias genéticas dentro dos subtipos e entre subtipos diferentes	37
Tabela 6 – Distribuição das novas sequências portuguesas por subtipos	38
Tabela 7 – Distâncias genéticas dentro dos subgrupos B e entre subgrupos B	40
Tabela 8 – Distâncias genéticas entre as amostras dos Açores do subgrupo B1	41
Tabela 9 – Distâncias genéticas entre as novas sequências portuguesas do subtipo A	44

Tabela 10 – Distâncias genéticas entre sequências do subtipo F	44
Tabela 11 – Percentagens de divergência nucleotídica entre sequências do subtipo E.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCD – <i>European Advisory Board on Cat Diseases</i>
Ac – anticorpo
Ag – antigénio
AZT – zidovudina ou azidotimidina
BLAST – <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp – pares de bases
CA – cápside
CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
DNA – ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dUTPase – desoxiuridina pirofosfatase
EIAV – vírus da anemia infecciosa equina
ELISA – <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA – Estados Unidos da América
FIV – vírus da imunodeficiência felina (<i>feline immunodeficiency virus</i>)
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
gpSU – glicoproteína de superfície
gpTM – glicoproteína transmembranária
HIV – vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IFI – ensaios de imunofluorescência indireta
IFN – interferão
IN – integrase
Kg – quilograma
LTR – repetição terminal longa
MA – matriz
mg – miligrama
MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
min – minutos
ml – mililitro
mRNA – RNA mensageiro
NC – nucleocápside
NCBI – <i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nm – nanómetro
ORF – <i>open reading frames</i>
pmol – picomole
PCR – reação em cadeia pela polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
PR – protease
<i>rev</i> – <i>regulator of virus gene expression</i>
rFeIFN- ω – interferão ómega recombinante felino
RNA – ácido ribonucleico
RT – transcriptase reversa
SC – subcutânea
seg – segundos
SI – sistema imunitário
SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
SIV – vírus da imunodeficiência símia (<i>simian immunodeficiency virus</i>)

UL – Universidade de Lisboa
UM – unidade por milhão
UV – ultra violeta
UZL – União Zoófila de Lisboa
Vf – volume final
vif – *virus infectivity factor*
WB – *Western Blot*
µl – microlitro
°C – graus Celsius

I. INTRODUÇÃO

1. TEMÁTICA E OBJETIVOS

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um importante agente patogénico em Medicina Veterinária, responsável por altas taxas de morbilidade e mortalidade em felinos domésticos e assilvestrados de todo o mundo (Dunham, 2006; Bande et al., 2012).

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz que impeça a transmissão e propagação do FIV é essencial para o controlo da infeção. Um dos principais problemas no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o FIV é a capacidade evolutiva deste lentivírus, como forma de escapar à resposta imunitária do hospedeiro. O principal alvo dos anticorpos neutralizantes é a glicoproteína do invólucro viral, codificada por regiões genómicas altamente variáveis. Esta variabilidade genética é resultado das altas taxas de mutação que ocorrem durante a transcrição reversa do RNA viral em DNA, para posterior integração do provírus no genoma de uma célula infetada.

Com base na diversidade genética do FIV, foram descritos, até à data, 6 subtipos, de A a F, com uma distribuição mundial não uniforme (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995; Pecoraro et al., 1996; Duarte & Tavares, 2006; Hayward, Kann, Seddon, Kyaw-Tanner & Meers, 2007; Taylor & Rodrigo, 2007; Hayward & Rodrigo, 2008). O estudo da diversidade genética do FIV e a identificação de subtipos são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de vacinação geográfica e temporalmente específicas (Sodora et al., 1994).

Embora já tenha sido introduzida uma vacina contra os subtipos A e D em alguns países, nomeadamente nos EUA, Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Japão, a sua eficácia não foi totalmente comprovada. Para a introdução de uma vacina contra o FIV na Europa, e em particular em Portugal, é necessário dar continuidade aos estudos de filogenia para subtipificação do vírus, com vista a desenvolver uma vacina geográfica e temporalmente eficaz. Paralelamente, a introdução de uma vacina em Portugal ou na Europa tem consequências diretas nos atuais métodos de diagnóstico de FIV, incapazes de distinguir Anticorpos (Ac's) vacinais de Ac's produzidos pela infeção natural. A introdução de uma vacina contra o FIV exige também uma reformulação dos métodos de diagnóstico atualmente disponíveis.

Por outro lado, o estudo da diversidade genética poderá ser útil na escolha de uma terapêutica específica, adaptada ao grau de patogenicidade do subtipo viral.

O FIV é também um objeto de estudo relevante em Medicina Humana, devido às semelhanças que apresenta com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tal como o HIV, o FIV é um

lentivírus linfotrópico, que causa uma síndrome de imunodeficiência adquirida em gatos domésticos. Para além de características morfológicas e bioquímicas, estes vírus partilham um padrão de patogenia muito similar, caracterizado por um longo período de latência clínica, durante o qual a função imunológica progressivamente se deteora. O FIV tornou-se por isso um excelente modelo animal para o estudo do HIV.

A diversidade genética do FIV pode então ser avaliada com base na análise de sequências nucleotídicas de diferentes regiões do genoma viral, nomeadamente: os domínios V3-V5 do gene *env* (Sodora et al., 1994; Pecoraro et al., 1996; Duarte & Tavares, 2006; Hayward et al., 2007; Hayward & Rodrigo, 2008); a região do gene *gag* codificante da proteína da cápside (CA) do virião (Hohdatsu et al., 1998; Kakinuma et al., 1995; Kurosawa et al., 1999; Marçola et al., 2013; Steinrigl & Klein, 2003); e a região correspondente à repetição terminal longa (LTR) (Phillips et al., 1990; Yamada et al., 1995; Duarte, Marques, Tavares & Fevereiro, 2002; Reggeti & Bienzle, 2004).

A diversidade genética do FIV já foi demonstrada em Portugal continental, tendo sido identificados 3 subtipos (A, B e F) na área metropolitana de Lisboa (Duarte et al., 2002; Duarte & Tavares, 2006).

O presente estudo pretende determinar a diversidade genética do FIV em algumas áreas geográficas de Portugal, incluindo o concelho de Lisboa, Moita e Ilha de São Miguel, com o objetivo de, em estudos posteriores, ser possível desenvolver e avaliar a introdução de uma vacina dirigida para os subtipos geograficamente prevalentes. Com base na análise filogenética da região V3-V5 do gene *env*, pretende-se demonstrar que a diversidade genética deste vírus em Portugal continental não é estática e, pela primeira vez, subtipificar isolados de FIV de outras regiões do país – Moita e Açores.

2. BREVE DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

A presente dissertação é o resultado do trabalho laboratorial desenvolvido durante o estágio curricular no Laboratório de Virologia, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (UL). Em cumprimento com os requisitos para a obtenção do grau de mestre, o estágio curricular, com início a 6 de Abril do ano de 2014, teve a duração de quatro meses, o que representou um total de 720 horas.

Durante o estágio curricular foram utilizadas diversas técnicas de biologia molecular¹, nomeadamente:

- Extração de DNA a partir de amostras de sangue total;
- Reação em cadeia pela polimerase (*polimerase chain reaction*, PCR):
 - PCR convencional;
 - *Nested*-PCR, para amplificação da região V3-V5 do gene *env* e da região LTR;
 - PCR em tempo real (rt-PCR);
- Purificação de DNA a partir de reações de PCR;
- Clonagem do fragmento V3-V5 do gene *env*, num vetor plasmídico, usando a bactéria *Escherichia coli* para propagação do vetor;
- Eletroforese:
 - Em géis de agarose, para avaliação da eficiência de amplificação do PCR;
 - Em géis de poliacrilamida, para determinação de heteroduplexes;
- Extração e purificação de DNA a partir de géis de agarose.

Além das técnicas laboratoriais, foram também utilizadas metodologias computacionais para a obtenção, análise e manipulação de dados genéticos, tais como:

- *CLC Workbench*:
 - Alinhamento múltiplo de sequências através do algoritmo *ClustalW*;
- *Mega6*:
 - Construção de uma árvore filogenética pelo método *Neighbor-Joining*;
 - Estimativa de divergências genéticas entre pares de sequências, com obtenção de uma matriz triangular, através do método *Kimura two-parameter*.
- *Excel*, para exportação de matrizes triangulares de distâncias genéticas e cálculo de valores de média, máximo e mínimo para diversos grupos de sequências nucleotídicas (subtipos, subgrupos e outros aglomerados).

¹ Algumas das técnicas de biologia molecular aplicadas durante o estágio não contribuíram para a obtenção dos resultados finais deste estudo, pelo que não constam no capítulo MATERIAL E MÉTODOS.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. IMUNODEFICIÊNCIA FELINA

1.1. Etiologia

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um importante agente patogénico em gatos domésticos, responsável pelo desenvolvimento de uma síndrome de imunodeficiência adquirida similar à observada em humanos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Devido às semelhanças biológicas entre ambos, o FIV é utilizado como modelo para o estudo da patogenia do HIV e para o desenvolvimento de estratégias de vacinação (Sodora et al., 1994; Bendinelli et al., 1995; Bachmann et al., 1997; Caldas, de Souza Leal, Silva & Ravazzolo, 2000; Burkhard & Dean, 2003; Duarte & Tavares, 2006).

Taxonomicamente, o FIV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e género *Lentivirus* (*International Committee on Taxonomy of Viruses* [ICTV], 2013), tendo sido pela primeira vez isolado em 1986, em Petaluma, no Estado da Califórnia (Pedersen, Yamamoto, Ishida & Hansen, 1989).

Para além do gato doméstico (*Felis catus*), o FIV infeta numerosas espécies de felinos selvagens (Troyer et al., 2005). Carpenter e O'Brien (1995) relataram a identificação de Ac's contra o FIV em 16 espécies de felinos silvestres, embora com menor carga viral e sem evidência de patogenicidade (Olmsted et al., 1992; Carpenter & O'Brien, 1995), o que leva a crer que felinos não-domésticos estarão em contacto com o vírus há mais tempo que o gato doméstico (Sellon & Hartmann, 2012).

1.1.1. Estrutura e organização genómica do virião

Como característico dos retrovírus, o virião do FIV (Figura 1) apresenta um genoma diplóide, composto por duas cópias de RNA, de cadeia simples e sentido positivo (codificante), com cerca de 9400 nucleótidos (Turner, McLennan, Bates & White, 2000, p. 196; Paillart, Shehu-Xhilaga, Marquet & Mak, 2004; Elder, Lin, Fink & Grant, 2010; Maclachlan, Dubovi & Fenner, 2011, p. 8).

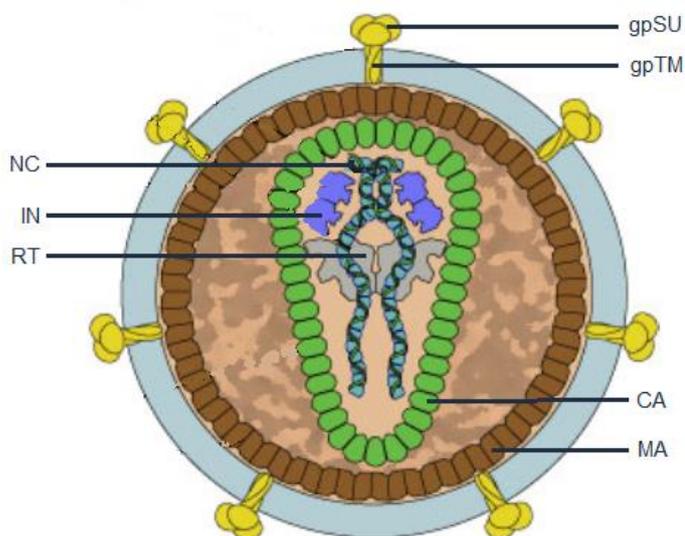
O genoma viral está associado a proteínas da nucleocápside (NC), formando um complexo envolvido pela CA, que por sua vez está associada à matriz (MA) (Sparger, 2006).

A replicação do FIV está dependente de enzimas codificadas pelo próprio vírus, como é o caso da transcriptase reversa (RT), da integrase (IN) e da protease (PR). A RT é responsável pela transcrição reversa, da qual resulta uma molécula de DNA de cadeia dupla – o provírus –

que é integrado posteriormente no genoma da célula hospedeira, por intermédio da IN. A PR é responsável pela clivagem das proteínas da CA, na fase de maturação do vírus (Turner, McLennan, Bates & White, 2000, pp. 296 – 297; Maclachlan, Dubovi & Fenner, 2011, p. 244; Duarte, Gil, Leal & Tavares, 2012, p. 37).

Fora da célula hospedeira, o virião maduro apresenta uma forma esférica a elipsóide, com 100 a 125 nanómetros (nm) de diâmetro (Dunham & Oswald, 2006, p. 150).

Figura 1 – Esquema representativo da estrutura de um virião do FIV, adaptado de Bendinelli et al., 1995 e http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/264.ht.



Legenda:

- gpSU – Glicoproteína de superfície (gp95);
- gpTM – Glicoproteína transmembranária (gp40);
- NC – Nucleocápside;
- IN – Integrase;
- RT – Transcriptase reversa;
- CA – Cápside;
- MA – Matriz.

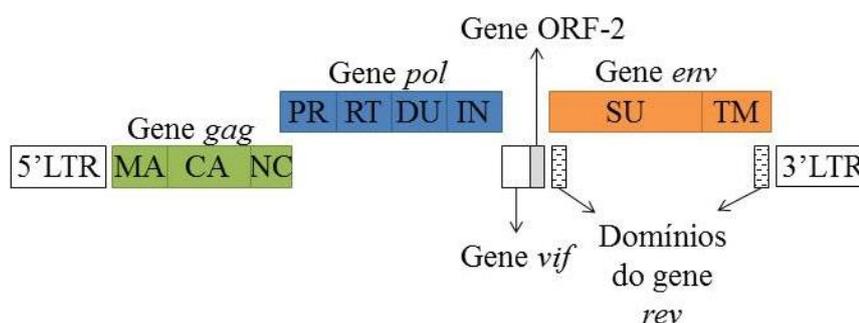
O processo de transcrição reversa não é absolutamente preciso, sendo introduzidos erros no genoma viral, o que resulta na alta variabilidade genética dos viriões produzidos. Alguns desses erros podem ser responsáveis pela alteração da antigenicidade viral, conferindo ao vírus uma vantagem de sobrevivência, na medida em que lhe confere adaptação à resposta imunitária do hospedeiro (Dunham & Graham, 2008; Domingo, Biebricher, Eigen & Holland, 2001, p. 43;). Em virtude das altas taxas de mutação do FIV, num mesmo organismo, podemos encontrar diferentes populações virais, denominadas *quasispecies* (Domingo, Biebricher, Eigen & Holland, 2001; Duarte et al., 2012).

O provírus integrado é composto por 3 genes estruturais – *gag*, *pol* e *env* – ladeados por repetições terminais longas (LTRs) que regulam a expressão génica (Turner et al., 2000, p. 296; Dunham & Graham, 2008; Elder et al., 2010). Estes genes constituem o repertório estrutural e enzimático do vírus (Tomonaga & Mikami, 1996): o gene *gag* codifica as proteínas da CA, NC e MA; o gene *pol* codifica as enzimas responsáveis pela replicação viral – RT, IN, PR e desoxiuridina pirofosfatase (dUTPase); e o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope – a gp95 (glicoproteína de superfície [gpSU]) e a gp40 (glicoproteína transmembranária [gpTM]) (Bendinelli et al., 1995; Turner et al., 2000, pp. 296 – 298; Maclachlan et al., 2011, p. 246; Duarte, Gil, Leal & Tavares, 2012).

A entrada dos viriões do FIV na célula hospedeira é mediada pelas glicoproteínas do invólucro viral, o que faz delas o principal alvo do sistema imunitário (SI). As glicoproteínas ligam-se a recetores celulares específicos, através de uma interação sequencial. A gpSU liga-se ao recetor primário CD134, que se expressa nos linfócitos T CD4+, linfócitos B e macrófagos ativados, e posteriormente a gpTM liga-se ao recetor secundário, o co-recetor de quimiocinas – CXCR4 (Shimojima et al., 2004; Willett et al., 2007; Kenyon & Lever, 2011; Teixeira et al., 2011).

À semelhança de outros lentivírus, o genoma do FIV (Figura 2), para além dos 3 genes estruturais típicos dos retrovírus (*gag*, *pol* e *env*), contém genes auxiliares que codificam proteínas acessórias (Dunham & Graham, 2008; Duarte, Gil, Leal & Tavares, 2012).

Figura 2 – Esquema representativo da organização genómica do FIV, adaptado de Caldas et al. (2000) e de Carpenter & O'Brien (1995).



Legenda:

- 5'LTR e 3'LTR – repetição terminal longa da extremidade 5' e 3', respetivamente;
- MA – sequência nucleotídica do gene *gag*, codificante da matriz;
- CA – sequência nucleotídica do gene *gag*, codificante da cápside;
- NC – sequência nucleotídica do gene *gag*, codificante da nucleocápside;
- PR – sequência nucleotídica do gene *pol*, codificante da protease;
- RT – sequência nucleotídica do gene *pol*, codificante da transcriptase reversa;
- DU – sequência nucleotídica do gene *pol*, codificante da desoxiuridina pirofosfatase;
- IN – sequência nucleotídica do gene *pol*, codificante da integrase;
- SU – sequência nucleotídica do gene *env*, codificante da proteína de superfície;
- TM – sequência nucleotídica do gene *env*, codificante da proteína transmembranária.

A dUTPase, por exemplo, é uma proteína acessória codificada pelo gene *pol*, característica dos lentivírus de animais não primatas, que facilita a replicação do FIV em células com baixo índice mitótico, como é o caso dos macrófagos (Payne & Elder, 2001; Dunham, 2006). Outros genes acessórios, como o *vif* (ou ORF-1), *rev* e ORF-A (ou ORF-2), são responsáveis pela regulação temporal do padrão de transcrição do vírus (Bendinelli et al., 1995; Duarte et al., 2012, p. 37).

O gene *vif* codifica uma proteína acessória necessária para a infeciosidade dos viriões (Gemeniano, Sawai, Leutenegger & Sparger, 2003). É um gene que está presente em todos os lentivírus, à exceção do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), e que se localiza na região central do genoma, entre os genes *pol* e *env* (Tomonaga & Mikami, 1996). É idêntico, em tamanho e localização no genoma, ao gene, com o mesmo nome, de lentivírus que afetam primatas (Tomonaga et al., 1992). O seu papel no ciclo de vida do FIV não é totalmente conhecido, embora se saiba que é essencial para uma replicação viral eficiente em diversas linhagens de células (Paul, Casey, Avery & Sutton, 2007; Elder, Lin, Fink & Grant, 2010). Mutações ao nível deste gene podem ser responsáveis pela atenuação da replicação do vírus (Paul et al., 2007).

O gene *rev* é composto por dois domínios funcionais que codificam uma proteína reguladora pós-transcricional, localizada nos nucléolos das células infetadas pelo FIV (Phillips et al., 1992; Gemeniano, Sawai, Leutenegger & Sparger, 2003), que facilita a exportação de RNA viral do núcleo para o citoplasma. A concentração citoplasmática de RNA mensageiro (mRNA) do gene *rev* desencadeia a passagem para a fase produtiva do ciclo replicativo (Maclachlan et al., 2011; Duarte et al., 2012). Os provírus do HIV e do vírus da imunodeficiência símia (SIV) que carecem de um gene *rev* funcional não conseguem produzir as proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *env*, apresentando uma replicação deficiente (Bendinelli et al., 1995).

O gene ORF-A é relativamente pequeno, apresentando apenas 234 nucleótidos, e é responsável pela produção de uma proteína acessória de 77 aminoácidos, reportada como essencial para a eficiente replicação do FIV em linfócitos (Pistello et al., 2002; Gemeniano et al., 2003). Esta proteína parece apresentar um papel importante na fase final do ciclo de vida do FIV, que envolve a formação do virião, e na infeciosidade do mesmo (Gemeniano et al., 2003). Acredita-se que este gene represente um transativador² viral, já que apresenta funções idênticas às da proteína Tat de outros lentivírus (Pistello et al., 2002). As proteínas Tat são classificadas em 2 grupos, consoante o poder de transativação. O primeiro grupo corresponde

² Em genética e biologia molecular, transativação diz respeito ao aumento da taxa de expressão génica.

às proteínas Tat do HIV, SIV, vírus da imunodeficiência bovina e EIAV, que são responsáveis por uma forte transativação da região LTR, sendo essenciais para a replicação viral. O segundo grupo diz respeito às proteínas Tat do vírus Visna-Maedi e do vírus da artrite-encefalite caprina, que, embora exerçam transativação sobre a LTR, são dispensáveis para a replicação dos respectivos vírus. Apesar de o produto e funções exatas do ORF-A não serem totalmente conhecidos, diversos estudos sugerem que o seu produto genético é análogo às proteínas Tat do segundo grupo. Com base no alinhamento amino-acídico da proteína que resulta da tradução do gene ORF-A com proteínas Tat de outros lentivírus, verifica-se que o ORF-A é mais próximo da Tat de ungulados que da Tat do HIV ou do SIV. Tal como o gene *rev*, o gene Tat dos lentivírus que afetam primatas é composto por dois exões. O FIV não apresenta um gene Tat, mas contém no seu genoma o gene ORF-A que se assemelha, em tamanho e localização no genoma, ao primeiro exão do gene Tat de outros lentivírus (Tomonaga & Mikami, 1996).

1.2. Epidemiologia

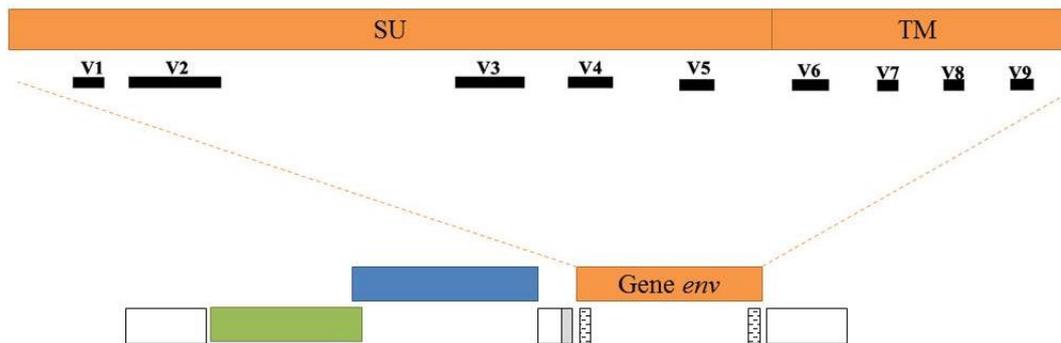
1.2.1. Epidemiologia molecular e subtipificação viral

Sodora e seus colaboradores (1994), à semelhança do que foi feito para o HIV, pesquisaram padrões de diversidade genética no FIV, naquele que foi o primeiro estudo de subtipificação molecular do vírus. Isolados de FIV de origens geográficas distintas foram divididos em 3 subtipos (A, B e C) com divergências nucleotídicas de 17,8 a 26,2%. Esta subtipificação molecular foi obtida com base na análise da região V3-V5 do gene *env*.

De entre os genes estruturais referidos anteriormente, o gene *env* é o que apresenta maior grau de variação em termos de dimensão e sequência nucleotídica (Phillips et al., 1990; Sodora et al., 1994; Tijhaar et al., 1997), tendo sido descritos 9 domínios variáveis, de V1 a V9 (Pancino, Chappey, Saurin & Sonigo, 1993) (Figura 3).

Os domínios V1 e V2 constituem a chamada região líder, que se sobrepõe ao primeiro exão de codificação do gene *rev*, embora numa grelha de leitura distinta. O produto que resulta da tradução destes domínios não faz parte do invólucro devido ao processamento proteolítico que ocorre após a tradução proteica (Phillips et al., 1992; Verschoor et al., 1993).

Figura 3 – Diagrama representativo dos 9 domínios variáveis do gene *env*, adaptado de de Rozieres et al. (2004).



Legenda:

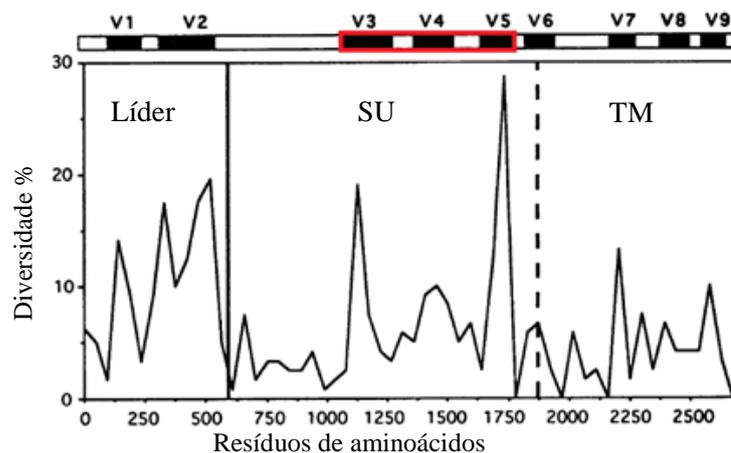
V1-V9 – domínios variáveis do gene *env*;

SU – sequência nucleotídica do gene *env*, responsável pela codificação da glicoproteína de superfície;

TM – sequência nucleotídica do gene *env*, responsável pela codificação da glicoproteína transmembranária.

Aparentemente, a maior diversidade nucleotídica é verificada na sequência de 684 nucleótidos, correspondente aos domínios V3, V4 e V5 da gpSU (Sodora et al., 1994; Siebelink et al., 1995; Bendinelli et al., 2001) (Figura 4).

Figura 4 – Percentagem de alterações nucleotídicas em função dos domínios e regiões variáveis do gene *env*, adaptado de Sodora et al. (1994)



Legenda:

V1-V9 – domínios variáveis do gene *env*;

Líder – região líder do gene *env* (engloba domínios V1 e V2);

SU – região do gene *env* correspondente à glicoproteína de superfície (engloba domínios V3 a V5);

TM – região do gene *env* correspondente à glicoproteína transmembranária (engloba domínios V6 a V9).

Uma variação na sequência nucleotídica do gene *env* poderá resultar numa alteração da sequência amino-acídica das proteínas do invólucro viral, em particular das glicoproteínas de superfície, o que afeta o tropismo celular do vírus e a adesão e fusão à membrana da célula hospedeira, comprometendo portanto a própria replicação viral. Siebelink e seus colaboradores (1993 e 1995) demonstraram que uma mutação pontual não sinónima na sequência nucleotídica do gene *env* pode conferir resistência à neutralização viral, isto porque as glicoproteínas do invólucro contêm epítomos responsáveis pela resposta imunitária, que são também importantes para o diagnóstico laboratorial da infeção (de Rozieres et al., 2004; Dunham & Oswald, 2006, p. 158).

A subtipificação genética do FIV é então maioritariamente feita com base na análise genética do gene *env*. Contudo, vários estudos demonstraram ser possível realizar a mesma classificação com base na análise de uma região de 329 pares de bases (bp) do gene *gag*, correspondente à CA (Hohdatsu et al., 1998; Kakinuma et al., 1995; Kurosawa et al., 1999; Marçola et al., 2013; Steinrigl & Klein, 2003), embora este gene apresente uma taxa de conservação mais elevada (Kakinuma et al., 1995). Iwata e Holloway (2008) referem até que a análise do gene *gag* poderá fornecer informações úteis no que diz respeito à recombinação viral e à semelhança entre isolados virais e estirpes vacinais.

Diversos estudos de filogenia reportam a divisão de isolados do FIV em subtipos com distâncias genéticas entre eles de aproximadamente 20%, tendo sido identificados e bem caracterizados 6 subtipos, de A a F (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995; Pecoraro et al., 1996; Duarte & Tavares, 2006; Hayward et al., 2007; Taylor & Rodrigo, 2007; Hayward & Rodrigo, 2008). Além destes, foram documentados outros subtipos desconhecidos (Hayward & Rodrigo, 2010). Na Nova Zelândia, por exemplo, com base na análise filogenética da região V3-V6 do gene *env*, Hayward e seus colaboradores (2007) constataram que um grupo de 17 amostras não agrupava com nenhum dos subtipos até à data descritos. As amostras em questão foram inclusivamente testadas num programa de identificação de recombinantes no qual se obtiveram resultados negativos, pelo que os autores do estudo defenderam poder tratar-se de um novo subtipo, designando-o subtipo U (*unknown subtype*). Também no Distrito Federal do Brasil, Marçola e seus colaboradores (2013) identificaram uma amostra que se destacou com evidência do subtipo B, sugerindo a emergência de um novo subtipo no Brasil, que denominaram subtipo DF. Na Turquia, Oğuzoğlu e seus colegas (2010) identificaram uma amostra que, não tendo agrupado com nenhum dos subtipos caracterizados, poderá representar igualmente um novo subtipo.

A identificação dos diversos subtipos genéticos permitiu a detecção de vírus recombinantes e de co-infeções com diferentes subtipos (Kann et al., 2007). A plasticidade genética do FIV é também refletida pela distinção de subgrupos dentro do mesmo subtipo (Sodora et al., 1994; Reggeti & Bienzle, 2004; Weaver, Collisson, Slater, & Zhu 2004; Sellon & Hartmann, 2012).

1.2.2. Distribuição e prevalência

Pecon-Slaterry, Troyer, Johnson e O'Brien (2008) propuseram um ancestral comum para os diferentes subtipos do FIV e sugeriram a transmissão entre espécies, indicando o Continente Africano como ponto de origem da disseminação global.

A distribuição geográfica dos diferentes subtipos não é uniforme (Tabela 1), sendo contudo os subtipos A e B os mais prevalentes a nível mundial (Bachmann et al., 1997).

Tabela 1 – Distribuição mundial dos subtipos do FIV.

Localização	Subtipo							
	A	B	C	D	E	F	U ^P	DF ^P
Europa	Sobretudo Norte-Ocidental	Sobretudo Centro e Sul	x	x		Apenas identificado em Portugal		
Portugal	x	x				x		
Canadá	x	x	x					
EUA	Oeste	Sobretudo Centro e Este	x			Apenas identificado no Texas*		
Nicarágua	x							
Brasil		x						x
Argentina	x	x			x			
África do Sul	x		x					
Turquia		x						
Japão	Sobretudo Oeste	Sobretudo Este	x	x				

Tabela 1 – Distribuição mundial dos subtipos do FIV (continuação).

Localização	Subtipo							
	A	B	C	D	E	F	U ^P	DF ^P
Taiwan		x	x					
Vietname			x	x				
Austrália	x	x						
Nova Zelândia	x		x				x	

Nota. P – Subtipos putativos; *Weaver e seus colaboradores (2004) descreveram um grupo de isolados no Texas distinto do subtipo B, sugerindo a emergência de um novo subtipo nos EUA, não descartando a possibilidade de se tratar de um subgrupo dentro do subtipo B. Em Portugal, Duarte e Tavares (2006) propuseram um novo subtipo, o subtipo F. Nesse estudo, incluíram nas árvores filogenéticas os isolados do Texas, confirmando o seu agrupamento no subtipo B. No entanto, num estudo posterior, Weaver (2010) refere-se ao grupo de isolados do Texas enquanto novo subtipo, designando-o igualmente subtipo F.

A informação que consta nesta tabela foi recolhida de diversas fontes: Greene, Meers, Chadwick, Carnegie & Robinson, 1993; Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995; Yamada et al., 1995; Pecoraro et al., 1996; Bachmann et al., 1997; Inada et al., 1997; Pistello et al., 1997; Carpenter, Brown, MacDonald & O'Brien, 1998; Nishimura et al., 1998; Uema et al., 1999; Nakamura et al., 2003; Reggeti & Bienzle, 2004; Weaver et al., 2004; Duarte & Tavares, 2006; Kann et al., 2006, 2007; Hayward et al., 2007; Martins et al., 2008; Hosie et al., 2009; Su et al., 2009; Nakamura et al., 2010; Oğuzoğlu et al., 2010; Steinrigl, Ertl, Langbein & Klein, 2010; Weaver, 2010; Kelly et al., 2011; ABCD, 2012; Sellon & Hartmann, 2012; Marçola et al., 2013.

A prevalência da infeção, tal como o subtipo, varia de acordo com a localização geográfica (Bendinelli et al., 1995; Hosie et al., 2009) e está associada a fatores de risco como o sexo, a idade, o estado reprodutivo dos animais (castrados ou inteiros), a densidade populacional e as condições de habitação, em particular a frequência de acesso ao exterior e o envolvimento em lutas (Bendinelli et al., 1995; Norris et al., 2007; Chhetri, Berke, Pearl & Bienzle, 2013; Marçola et al., 2013). A prevalência é maior em populações de alta densidade, sobretudo se houver livre movimentação (Pedersen et al., 1989), como acontece em Itália e no Japão (Sellon & Hartmann, 2012). Gatos assilvestrados apresentam por isso prevalências mais altas que os gatos domésticos: 8-19% e 4-12%, respetivamente (Courchamp & Pontier, 1994; Courchamp, Yoccoz, Artois, & Pontier, 1998; Baneth, Kass, Steinfeld, & Besser, 1999; Winkler, Löchelt, & Flower, 1999; Ostrowski, Van Vuuren, Lenain, & Durand, 2003; Danner, Goltz, Hess & Banko, 2007). Populações de leões (*Panthera leo*) em zonas endémicas de África podem atingir prevalências de FIV de 90% (Olmsted et al., 1992; Carpenter &

O'Brien, 1995; Courchamp, Yoccoz, Artois & Pontier, 1998; Troyer et al., 2005; Brennan et al., 2006; VandeWoude & Apetrei, 2006).

Estudos experimentais e sero-epidemiológicos indicam que a principal forma de transmissão do FIV é através de mordidas. Como os machos têm maior tendência para o comportamento agressivo, sobretudo nas épocas de cio e devido à necessidade de marcação territorial, apresentam uma probabilidade de infecção quase duas vezes superior à das fêmeas (Yamamoto et al., 1989; Bendinelli et al., 1995; Akhtardanesh, Ziaali, Sharifi & Rezaei, 2010). A taxa de infecção em gatos de livre movimentação aumenta ao longo da vida, refletindo a crescente agressividade (Courchamp et al., 1998). Akhtardanesh e seus colaboradores (2010) constataram que o risco de infecção por FIV aumenta 1,84 vezes por cada ano de idade do animal. Assim, gatos machos, mais velhos e selvagens ou vadios apresentam uma maior probabilidade de estar infetados (Pedersen et al., 1989; Yamamoto et al., 1989; Maclachlan et al., 2011; Bande et al., 2012). A prevalência entre animais saudáveis e doentes também varia, sendo 2 a 3 vezes superior em animais doentes (Hosie, Robertson & Jarrett, 1989; Hosie, Osborne, Yamamoto, Neil & Jarrett, 1995).

Em estudos de prevalência da infecção por FIV, os valores mais baixos observados correspondem a gatos, sem sintomatologia aparente, na Europa central e EUA (1%), em contraste com o Japão e Austrália, cujos valores chegam aos 30% (Bendinelli et al., 1995). Em Portugal, foi realizado um estudo em 2010 com gatos errantes, na área metropolitana de Lisboa, tendo-se obtido uma prevalência de 10,2% (Duarte et al., 2010). Recentemente, um estudo realizado na Ilha de São Miguel, nos Açores, em 90 gatos errantes com mais de 6 meses, revelou uma prevalência de 14,2% (Botelho, 2014).

1.2.3. Modo de transmissão

A mordedura é o modo mais frequente de transmissão natural do FIV, através da inoculação do próprio vírus ou de células infetadas pelo mesmo (Yamamoto et al., 1989). A probabilidade de transmissão através de mordedura depende de fatores como a carga e o subtipo virais presentes no animal portador (Hosie et al., 2009).

O FIV pode ser isolado a partir da saliva, sangue total, plasma, soro, líquido cefalorraquidiano e sémen de gatos infetados (Matteucci et al., 1993; Norris et al., 2007; Sellon & Hartmann, 2012). Fora do hospedeiro, o vírus sobrevive apenas por alguns minutos e é suscetível a todos os desinfetantes, incluindo o sabão comum (ABCD, 2012).

Em condições experimentais, mostrou-se ser possível infetar animais saudáveis através da inoculação do vírus na mucosa vaginal, retal e bucal, embora este tipo de transmissão natural não tenha sido documentado (Moench et al., 1993). A inoculação parentérica de sangue,

plasma e fluidos com culturas de célula infetadas apresentou igualmente resultados positivos (Yamamoto et al., 1988). Foram ainda relatadas taxas relativamente altas (50%) de transmissão vertical, tanto por via transplacentária, como no parto e pós-parto, através da ingestão de colostro e leite materno de fêmeas com infeções crónicas ou agudas (Duarte et al., 2012; Sellon & Hartmann, 2012). A proporção de crias infetadas por via transplacentária e no parto depende da carga viral da mãe. Em casos de infeção aguda durante a gestação ou parto, geralmente, mais de 70% das crias são infetadas, ao passo que em fêmeas clinicamente normais mas com infeção crónica, a probabilidade de infeção das crias é quase nula (O'Neil, Burkhard, Diehl & Hoover, 1995; O'Neil et al., 1996). No entanto, fêmeas com infeção crónica poderão transmitir o vírus através do colostro e leite em quantidade suficiente para induzir infeção ativa em mais de 60% das suas crias (O'Neil et al., 1996). Apesar de a saliva ter uma carga viral importante, a transmissão do FIV devido ao *grooming* materno parece ser pouco relevante (Maclachlan et al., 2011, p. 272).

Dandekar e seus colaboradores (1992) demonstraram também ser possível a transmissão horizontal por contacto íntimo entre animais que vivem pacificamente durante longos períodos de tempo.

1.3. Patogenia da infeção e apresentação clínica

O FIV tem um tropismo para células do sistema mononuclear, infetando linfócitos B e T, monócitos e macrófagos em diversos órgãos, embora experimentalmente seja capaz de se replicar em células diferentes. As concentrações mais elevadas do vírus verificam-se, logo na primeira semana após infeção, na medula óssea, timo e linfonodos, e em concentrações mais baixas no rim, fígado e pulmões (Bendinelli et al., 1995). O tropismo é variável consoante a fase de infeção. Na fase aguda, são afetados linfócitos T CD4+ (*T-helper*) e CD8+ (T-citotóxicos), verificando-se uma inversão na fase crónica para células B, monócitos e macrófagos (English, Johnson, Gebhard & Tompkins, 1993; Dean, Reubel, Moore & Pedersen, 1996; Duarte et al., 2012). Alguns estudos evidenciaram também tropismo para células dendríticas foliculares e para células do sistema nervoso central – micróglia e astrócitos (Dow, Dreitz & Hoover, 1992; Bach et al., 1994).

Como referido anteriormente, o virião do FIV entra na célula hospedeira por intermédio de dois recetores da célula-alvo, específicos para as glicoproteínas do invólucro viral. O mecanismo de entrada do virião é sequencial. A gp95 (gpSU) liga-se ao recetor CD134 e ocorre uma alteração conformacional que permite a ligação entre o recetor de quimiocinas CXCR4 e a gp40 (gpTM), permitindo a fusão da membrana da célula hospedeira com o

invólucro viral e consequente libertação da nucleocápside viral para o citoplasma da célula-alvo (Bendinelli et al, 1995; Shimojima et al., 2004; Willett et al., 2007; Dunham & Graham, 2008; Kenyon & Lever, 2011; Teixeira et al., 2011; ABCD, 2012; Duarte et al., 2012; Sellon & Hartmann, 2012). No citoplasma, a RT viral inicia a transcrição reversa do RNA genômico do vírus, originando uma molécula de DNA de cadeia dupla que é integrada no genoma da célula hospedeira enquanto provírus. O processo de integração é catalisado pela IN. Graças à integração no genoma celular das células linfóides e mielomonocíticas, o FIV tem a capacidade de produzir uma infecção persistente. Uma vez que a transcrição reversa do RNA viral não é um processo preciso, podem ocorrer erros de leitura, os quais muitas vezes resultam em mutações responsáveis pelo aparecimento de novas estirpes que escapam à detecção imunológica. A maioria das mutações envolve apenas a mudança de um nucleótido (mutações pontuais), embora também possam ocorrer deleções ou inserções de um ou mais nucleótidos (Domingo et al., 2001, p. 42; Dunham & Graham, 2008; Kenyon & Lever, 2011; Maclachlan et al., 2011, p. 139; ABCD, 2012; Duarte et al., 2012).

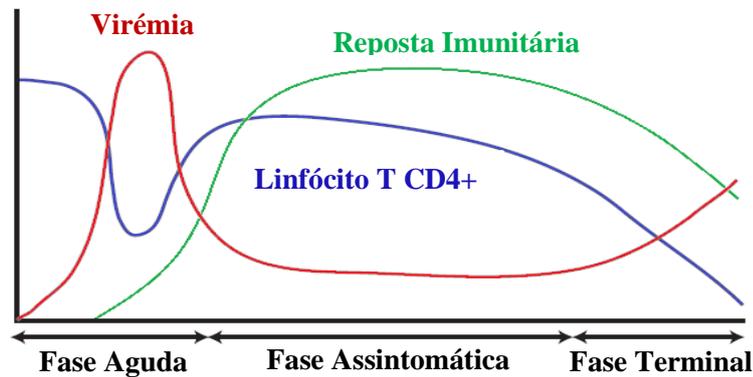
A cadeia de DNA viral integrada é transcrita em conjunto com o DNA da célula hospedeira, originando RNA genômico viral e mRNAs, de acordo com a regulação de expressão viral efetuada pelos produtos do gene ORF-A e *rev*. A produção de novos viriões é efetuada após transporte do núcleo para o citoplasma dos mRNAs codificantes das proteínas estruturais do virião e do RNA genômico viral. Após tradução das proteínas estruturais no citoplasma, o virião migra para a superfície da célula hospedeira, abandonando a mesma e adquirindo um novo invólucro com participação da membrana celular (Bendinelli et al., 1995; Kenyon & Lever, 2011; Maclachlan et al., 2011, p. 35; Siebelink et al., 1992).

A evolução da doença é lenta e progressiva, com aparecimento tardio de sinais clínicos (Caldas et al., 2000; Oğuzoğlu et al., 2010), causados, na sua maioria, por infecções oportunistas, resultantes da imunodeficiência induzida pela infecção viral das células do sistema imunitário. Por este motivo, é de extrema importância a identificação da causa subjacente aos sinais clínicos (ABCD, 2012).

O período de contágio é longo, por isso, mesmo que a carga viral seja baixa, o vírus mantém-se facilmente numa população (Maclachlan et al., 2011).

Considerando a evolução temporal da infecção, Dunham e Graham (2008) descrevem três fases: aguda, assintomática e terminal (Figura 5).

Figura 5 – Evolução temporal da infecção por FIV, adaptado de Dunham & Graham (2008).



Durante a fase aguda, que pode durar meses, ocorre entre as 8 e as 12 semanas pós-infecção um pico de virémia, resultante da rápida replicação viral nas células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4+. Esta primeira fase caracteriza-se por um quadro clínico fugaz, com sinais clínicos pouco específicos: febre, anorexia, vômito, letargia, linfadenomegália generalizada, linfopenia por diminuição dos linfócitos T CD4+, enterite, estomatite (Figura 6), dermatite, conjuntivite e infecções respiratórias.

Figura 6 – Estomatite num gato infetado por FIV (fonte: Sellon & Hartmann, 2012).



Segue-se uma resposta imunitária ativa, que anuncia o início da fase assintomática, marcada pela produção de Ac's anti-FIV, diminuição da carga viral e um aumento persistente de linfócitos CD8+, com inversão do rácio CD4+:CD8+ (Ackley, Yamamoto, Levy, Pedersen & Cooper, 1990; Novotney et al., 1990; Dandekar et al., 1992; English et al., 1993; Dunham & Graham, 2008; Hosie et al., 2009; Hosie, Pajek, Samman & Willett, 2011; Duarte et al., 2012; Sellon & Hartmann, 2012).

Os Ac's anti-FIV são detetáveis no sangue cerca de duas a seis semanas após infecção, dependendo, entre outros fatores, da carga viral (Bendinelli et al., 1995; Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012). Os Ac's direcionados para o gene *gag* são identificados em animais experimentalmente infetados mais tardiamente que os direcionados para o gene *env* (Rimmelzwaan et al., 1994). Durante a fase assintomática, que pode durar anos, a carga viral no plasma mantém-se a níveis relativamente baixos, embora seja detetável uma ligeira diminuição da contagem de linfócitos T CD4+. Na fase terminal da infecção, há uma descida da imunidade antiviral e por conseguinte a carga viral plasmática torna a subir (Dunham & Graham, 2008), apresentando-se o paciente com uma imunodepressão evidente, com manifestações clínicas decorrentes das infeções oportunistas (Pedersen, Ho, Brown & Yamamoto, 1987; Yamamoto et al., 1988). Num estudo recente, Kann e seus colaboradores (2014) reforçam a evidência de uma relação entre a carga viral de RNA e a fase da infecção, sugerindo a medição deste parâmetro como método de previsão da evolução da doença.

A patogenicidade parece também estar relacionada com o subtipo viral (Oğuzoğlu et al., 2010). Estirpes virais com um tropismo mais abrangente infetam um maior número de células, podendo ser mais patogénicas (de Rozieres et al., 2004). Vahlenkamp e seus colaboradores (1999) relataram num estudo que a região que codifica as glicoproteínas do envelope contém determinantes que influenciam o tropismo celular do vírus, o que insinua uma relação entre o subtipo viral e a manifestação da doença. Os subtipos A e C, por exemplo, provocam encefalite e uma síndrome de imunodeficiência, associada ou não a sintomatologia, ao passo que felinos infetados pelo subtipo B manifestam geralmente sinais clínicos leves, como estomatite e gengivite (Oğuzoğlu et al., 2010). A baixa patogenicidade do subtipo B relativamente a outros subtipos sugere uma melhor adaptação do mesmo ao hospedeiro (Sodora et al., 1994).

1.4. Diagnóstico laboratorial

O risco de gatos assintomáticos infetados por FIV transmitirem o vírus é elevado, o que reflete a necessidade de um diagnóstico precoce (Alves et al., 2013).

Várias técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas para a deteção do FIV, tanto com base na pesquisa de antigénios (Ag's) como de Ac's. Como a infecção por FIV está associada a títulos elevados de Ac's e, na maior parte dos casos, os níveis de Ag's se mantêm abaixo do limiar de deteção, os testes comerciais de diagnóstico utilizados por rotina baseiam-se na deteção de Ac's anti-FIV específicos em soro, plasma ou sangue total de animais infetados (Bienzle et al., 2004; Richards, 2005; Dunham & Graham, 2008). Estes testes apresentam uma elevada

sensibilidade e especificidade, o que implica a ocorrência de falsos-positivos e de falsos negativos. Por este motivo, sempre que se verifique um resultado clínico e epidemiologicamente inesperado, os resultados devem ser confirmados recorrendo a outros testes (Mortola, Oliva, Riso, Pecoraro & Venturini, 2004).

1.4.1. Detecção de Anticorpo

Como referido anteriormente, os Ac's anti-FIV são detetáveis no sangue cerca de duas a seis semanas após infeção (Bendinelli et al., 1995; Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012), sendo que os Ac's direcionados para o gene *gag* (p24) são identificados em animais experimentalmente infetados mais tardiamente que os direcionados para o gene *env* (gp40) (Rimmelzwaan et al., 1994).

O teste de diagnóstico mais utilizado em clínica para deteção de FIV pesquisa a presença de Ac's anti-FIV, dirigidos normalmente contra a proteína da CA (p24) ou contra a glicoproteína transmembranária gp40, através da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Hartmann et al., 2007; Dunham & Graham, 2008; Levy et al., 2008a; Sand et al., 2010). Com menor frequência, recorre-se a outras técnicas para deteção de Ac's, como a Imunofluorescência e o *Western Blot* (WB) (Hosie et al., 2009), sobretudo para confirmação dos resultados obtidos pelo método de ELISA (Grace, 2011).

Uma das grandes desvantagens destes métodos é a impossibilidade de distinção entre Ac's induzidos pela infeção natural e Ac's resultantes da vacinação ou adquiridos pelo colostro materno (Richards, 2005; Levy et al., 2008b; Hosie et al., 2009; Grace, 2011; Sellon & Hartmann, 2012). Ao testar uma ninhada para FIV, deve-se ter em conta o estatuto clínico da mãe. Quando a mãe é seropositiva, as crias podem apresentar resultados falsos-positivos até aos 4 a 6 meses de vida, devido à presença de Ac's adquiridos pelo colostro, pelo que deverão ser testadas depois dessa idade (Dunham & Graham, 2008; Levy et al., 2008a; Hosie et al., 2009; Grace, 2011; Sellon & Hartmann, 2012).

1.4.1.1. ELISA

O método de diagnóstico de FIV baseado na técnica de ELISA parece apresentar excelente sensibilidade e especificidade (Levy, Crawford & Slater, 2004). Os testes de ELISA disponíveis no mercado consistem em *kits* de membranas ou poços de plástico revestidos por um único tipo de Ag marcado (geralmente p24) ao qual se ligam os Ac's anti-FIV (Bienzle et al., 2004).

Resultados falsos-negativos são raros, detetados no início de infeções agudas, antes da produção de Ac's anti-FIV (Bienzle et al., 2004). Quando a concentração do vírus no sangue é

elevada, a formação de imunocomplexos com sequestro de Ac's anti-FIV poderá também ser responsável por resultados falsos-negativos (Hosie et al., 2009).

Resultados falsos-positivos são geralmente atribuídos a má técnica (Bienzle et al., 2004) e ao uso de amostras de sangue total ao invés de plasma ou soro (Hartmann, Werner, Egberink & Jarret, 2001). A introdução de vacinas contra o FIV (nos EUA [Uhl, Heaton-Jones, Pu & Yamamoto, 2002; Sykes, 2013], Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Japão [Abbott, Pu, Coleman & Yamamoto, 2012; Sykes, 2013]) veio dificultar o diagnóstico laboratorial da doença nos países em que foi introduzida, uma vez que animais vacinados e crias de progenitoras vacinadas contra o FIV poderão apresentar resultados positivos, devido à presença de Ac's vacinais (Richards, 2005; Grace, 2011). Kusuhara e seus colaboradores (2007) demonstraram ser possível distinguir animais vacinados de animais naturalmente infectados através de uma técnica de ELISA por eles desenvolvida, com uma precisão de 97 a 98%, que usa quatro tipos de Ag's para pesquisa de Ac's anti-FIV. Este método provou ser o mais fiável para o diagnóstico de FIV, independentemente do estado de vacinação, com exceção do isolamento viral (Levy et al., 2008b). Além disso, constitui uma excelente alternativa à técnica de PCR, tendo em conta que por vezes os *primers* não reconhecem todas as variantes do vírus (Steinrigl & Klein, 2003), embora este tipo de teste só esteja disponível no Japão (Grace, 2011, p. 179). Para evitar que animais falsos-positivos sejam submetidos a eutanásia, os testes positivos em ELISA devem ser confirmados por WB (Courchamp et al., 1998) ou por imunofluorescência (Grace, 2011).

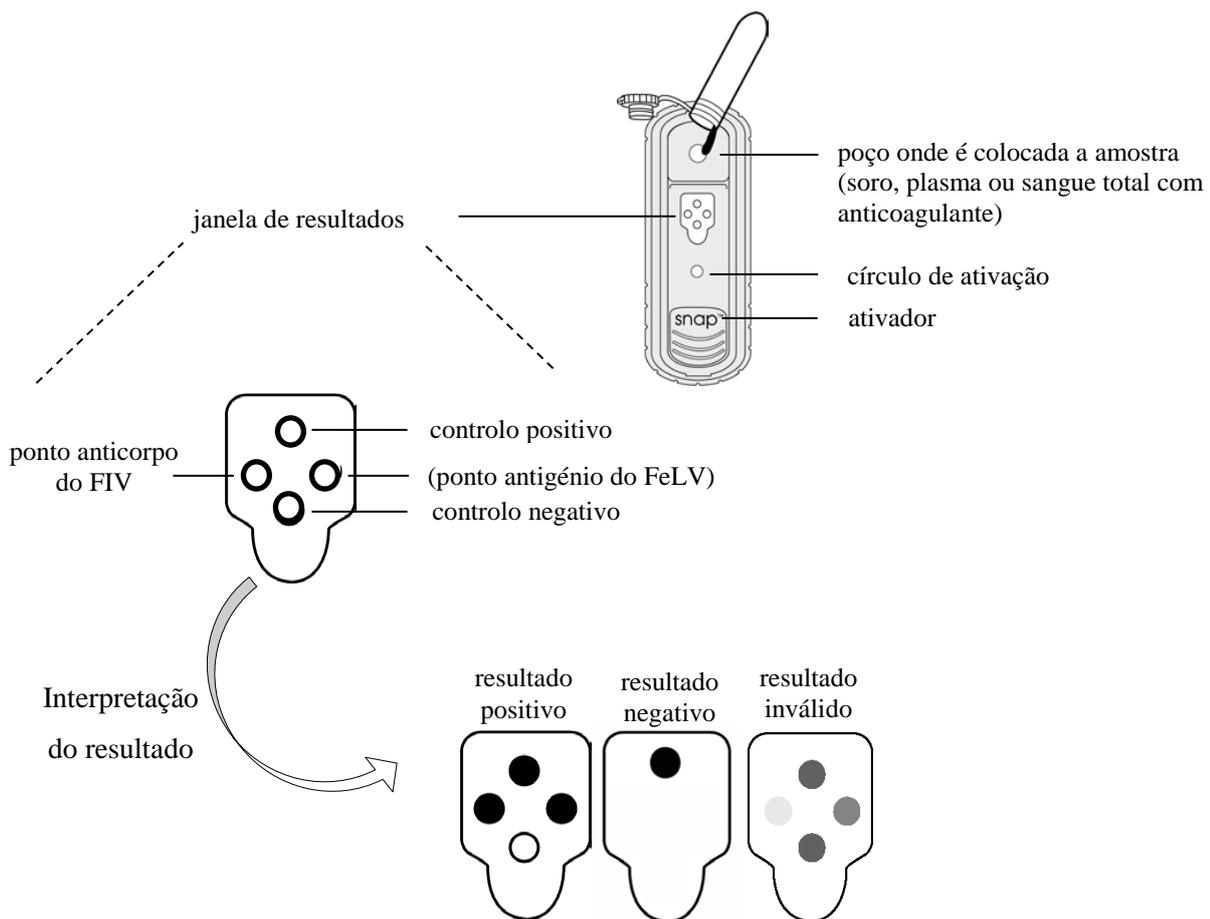
1.4.1.2. Imunocromatografia de membrana

A imunocromatografia de membrana é um teste com especificidade inferior a 100% (Hosie et al., 2009), baseado na técnica de ELISA, que utiliza um péptido sintético ou uma proteína recombinante para detetar Ac's contra a gp40 (Hartmann et al., 2001). Em caso de infeção, a presença de Ac's anti-FIV leva à formação de complexos Ag-Ac com a referida gpTM, complexos esses que migram num filtro de nitrocelulose (Hosie et al., 2009; Maclachlan, Dubovi & Fenner, 2011). Um reagente com uma substância cromogénica é adicionado e, em caso de resultado positivo, surge uma banda colorida (Maclachlan et al., 2011). O teste de bancada SNAP Combo Plus (IDEXX, Westbrook, Maine, EUA) é o que apresenta melhor desempenho (Hartmann et al., 2007). O resultado do teste é considerado positivo ou negativo dependendo do desenvolvimento da cor relativamente a um controlo positivo (O'Connor et al., 1989) (Figura 7).

Figura 7 – Esquema representativo da interpretação de um teste SNAP Combo Plus,

adaptado de

http://www.idexx.es/pdf/es_es/smallanimal/snap/combo/snap-combo-package-insert.pdf.



1.4.1.3. Imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) são testes rápidos (Lennette, Karpatkin & Levy, 1987; Mahony et al., 1989), com duração inferior a duas horas, exigindo contudo alguma experiência por parte do operador, já que a interpretação do teste é subjetiva (Gallo et al., 1986).

São usados Ac's anti-espécie, com um fluorocromo, que detetam a ligação de Ac's anti-FIV ao Ag. O teste é classificado como positivo se a célula infetada apresentar um padrão fluorescente, consistente com a distribuição de Ag (Maclachlan et al., 2011, p. 119).

A IFI é geralmente utilizada para confirmação de testes de ELISA positivos (Grace, 2011).

1.4.1.4. Western Blot

O WB é usado como um teste de confirmação para o FIV, devido à sua maior sensibilidade e especificidade quando comparado com os métodos de ELISA e PCR (Mortola et al., 2004; Hosie et al., 2009). O método tradicional de ELISA para detecção de Ac's anti-FIV recorre ao uso de um único tipo de Ag, geralmente a p24 (proteína da CA) ou a gp40 (Hartmann et al., 2007), ao passo que o WB deteta Ac's contra diversas proteínas virais (Crawford & Levy, 2007). É portanto considerado o método *gold standard* no diagnóstico de FIV baseado na detecção de Ac's (Dunham & Graham, 2008; ABCD, 2012).

1.4.2. Detecção de Antigénio

Com a introdução da vacinação contra o FIV, surgiu o problema de distinção entre Ac's vacinais, que persistem por mais de 3 anos em alguns gatos (Grace, 2011, p. 179), e Ac's resultantes da infeção natural. Por este motivo, é necessário confirmar a infeção com recurso a outros métodos, como a pesquisa de Ag (Richards, 2005; Dunham & Graham, 2008; Levy et al., 2008b; Hosie et al., 2009; Grace, 2011; Sellon & Hartmann, 2012).

1.4.2.1. Isolamento viral

A maioria dos gatos sofre seroconversão seis a oito semanas após infeção, embora alguns animais desenvolvam uma resposta imunitária muito discreta, quase sempre impossível de detetar através de testes imuno-serológicos, cujos resultados dariam negativo. Nestes casos, o diagnóstico pode ser efetuado com base no isolamento viral (Yamamoto et al., 1988).

O isolamento do vírus a partir de linfócitos do sangue é considerado o teste de diagnóstico definitivo para FIV (Mortola et al., 2004). O isolamento é feito a partir de culturas de células T primárias com linfócitos T de sangue periférico do animal suspeito e, ao fim de duas a três semanas, a presença do vírus é confirmada pela medição dos níveis de proteína viral no meio da cultura celular (Hosie et al., 2009; ABCD, 2012).

Apesar de ser um método fiável, é trabalhoso e dispendioso, exigindo técnicos especializados, não sendo por isso usado por rotina (Dunham & Graham, 2008; Hosie et al., 2009; ABCD, 2012; Sellon & Hartmann, 2012).

1.4.2.2. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A técnica de PCR permite detetar RNA viral e DNA de provírus, apresentando contudo sensibilidade e especificidade muito variáveis, de 40 a 100% (Levy et al., 2008b; Hosie et al., 2009; ABCD, 2012; Sellon & Hartmann, 2012), pelo que só deve ser usada como teste de

confirmação em gatos que previamente testaram positivo na pesquisa de Ac's (Grace, 2011, p. 179). Nos casos em que o animal está infetado mas a resposta imunitária é muito discreta, o PCR torna-se num método de diagnóstico particularmente útil (Sellon & Hartmann, 2012). Em determinadas situações, quando a carga viral está abaixo do limiar de detecção, o número de células infetadas na amostra é demasiado pequeno ou os *primers* não reconhecem a estirpe ou subtipo em questão, ocorrem falsos-negativos (Bendinelli et al., 1995; Dunham & Graham, 2008; Hosie et al., 2009; Grace, 2011).

1.5. Tratamento

Como a infeção por FIV é acompanhada por uma grande variedade de sinais clínicos, o tratamento baseia-se geralmente numa terapia sintomática e de suporte, recorrendo quando necessário à fluidoterapia e ao controlo das infeções secundárias com antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, entre outros, sendo a administração de antivirais pouco comum (Dunham & Graham, 2008; Sellon & Hartmann, 2012).

Gatos infetados por FIV desenvolvem frequentemente estomatites crónicas, que eventualmente resultam na perda de apetite, secundária à dor crónica, e na perda de peso, agravando a condição clínica dos animais. Nestas situações, a utilização de corticosteróides revela melhorias clínicas (ABCD, 2012), já que estes fármacos, para além de anti-inflamatórios, estimulam o apetite (Agnew & Korman, 2014). No entanto, a extração de todos os dentes é preferível ao uso prolongado de corticosteróides (Levy & Crawford, 2010).

Uma alternativa razoável para o tratamento é a utilização de imunomoduladores ou indutores da produção de interferão (IFN), que estimulam de forma inespecífica o sistema imunitário, permitindo ao animal controlar a carga viral e recuperar da doença (Doménech et al., 2011). No entanto, a sua utilização é discutível, uma vez que pode levar a um aumento da replicação viral por ativação de macrófagos e linfócitos infetados (Hosie et al., 2009). Existem dois tipos de IFN: o tipo I, que inclui, entre outros, o IFN- ω ; e o tipo II, que inclui apenas o IFN- γ (Pestka, Krause, & Walter, 2004). Os IFN's do tipo I exibem uma atividade antiviral e antiproliferativa, enquanto que os do tipo II têm uma função principalmente imunomoduladora. Os IFN's interagem com diferentes recetores celulares. Os linfócitos contêm recetores funcionais para o IFN- ω (Collado et al., 2007). O interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) é um fármaco usado com frequência em medicina veterinária como coadjuvante terapêutico em infeções retrovirais, nomeadamente por FIV (Hosie et al., 2009). A terapia com rFeIFN- ω parece potenciar a imunidade inata (Doménech et al., 2011), possibilitando a maximização do sistema imunitário, o que se traduz num melhor controlo das

infecções secundárias e consequentes melhorias clínicas dos animais infetados, aumentando o tempo de sobrevivência dos mesmos (de Mari, Maynard, Sanquer, Lebreux, & Eun, 2004; Gil et al., 2013; Gil et al., 2014). Num estudo recente, Gil e seus colaboradores (2013) demonstraram também que os gatos FIV positivos sujeitos a terapêutica com rFeIFN- ω reduziram a excreção de vírus concomitantes. O protocolo terapêutico recomendado para o rFeIFN- ω envolve três ciclos de administração (no dia 0, dia 14 e dia 60), cada um deles consistindo em administrações SC's de 1UM/kg, uma vez por dia, durante cinco dias (de Mari et al., 2004; Caddy, 2014). Recentemente foi sugerido um protocolo de administração oral de rFeIFN- ω em gatos FIV positivos com sintomatologia clínica, embora as alterações laboratoriais registadas tenham sido mais subtis. Além disso, com a administração oral, a absorção sistémica é limitada e as doses utilizadas mais baixas. Por este motivo, o protocolo oral será apenas uma alternativa ao subcutâneo nos casos em que este último seja difícil de realizar e apenas em gatos com uma ligeira a moderada apresentação clínica. Contudo, poderá ser uma opção interessante após o tratamento subcutâneo ter estabilizado a condição clínica do animal e depois de as infecções secundárias estarem controladas (Gil et al., 2014).

No que toca aos fármacos antivirais, a maioria dos que são utilizados em gatos são os mesmos que se utilizam em medicina humana, como o AZT (zidovudina ou azidotimidina), a ribavirina, a zalcitabina e o foscarnet, isoladamente ou combinados. Algumas das desvantagens associadas à administração destes medicamentos em gatos relaciona-se com o potencial tóxico e efeitos secundários dos mesmos, além de que as doses e os protocolos não estão bem estabelecidos (Caney, 2005; Katrin Hartmann, 2012; Sellon & Hartmann, 2012). Dos compostos antivirais referidos, o mais utilizado é o AZT, um análogo da timidina (Levy et al., 2008a) que bloqueia a RT, impedindo a integração do provírus no DNA genómico da célula hospedeira (Hosie et al., 2009; Duarte et al., 2012). Desta forma, o vírus não sofre replicação, o que leva à diminuição da carga viral plasmática e a uma consequente melhoria clínica e imunológica dos gatos FIV positivos (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012). A dose recomendada é de 5-10mg/kg, a cada 12 horas, *per os* ou por via subcutânea (SC), até se observarem melhorias clínicas (Levy et al., 2008a; Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012). Os gatos parecem tolerar bem o tratamento com AZT até dois anos. Durante esse período, e especialmente quando se administram doses altas do fármaco, devem ser realizados hemogramas completos semanalmente, devido à possibilidade de ocorrência de anemia não-regenerativa (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012), interrompendo-se o tratamento caso o hematócrito desça abaixo dos 20% (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012; Sykes, 2013). Seis meses após o início do tratamento com AZT, podem surgir, tal como

acontece com o HIV, mutações no genoma do FIV, que poderão eventualmente torná-lo resistente ao antiviral (Hosie et al., 2009; Sellon & Hartmann, 2012).

1.6. Vacinação

O desenvolvimento de estratégias de vacinação contra o FIV tem sido objeto de estudo em diversas experiências, algumas delas bem-sucedidas. Este interesse surgiu não só por se tratar de um vírus que é causa comum de morbidade e mortalidade em gatos de estimação, mas também por servir de modelo para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (Dunham & Oswald, 2006).

Uma das estratégias para o desenvolvimento de vacinas atenuadas consiste em silenciar regiões específicas do genoma viral, importantes para o potencial patogénico, mas dispensáveis para a replicação do vírus (Nathanson & Mathieson, 2000). A supressão de genes acessórios como o ORF-A ou o *vif* pode resultar na produção de vírus mutantes e atenuados, que podem então ser utilizados como vacinas (Waters et al., 1996; Lockridge et al., 2000; Pistello et al., 2002).

A primeira vacina contra o FIV a ser comercializada (Fel-O-Vax FIV®, Fort Dodge Animal Health, Pfizer) foi desenvolvida com duas estirpes inativadas – subtipo A da Petaluma e subtipo D de Shizuoka (Pu et al., 2001) –, e introduzida nos EUA em Julho de 2002 (Uhl, Heaton-Jones, Pu & Yamamoto, 2002; Sykes, 2013). Nos 6 anos seguintes, a vacina começou a ser também comercializada no Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Japão (Abbott et al., 2012; Sykes, 2013).

A introdução da vacina contra o FIV gerou alguma controvérsia, já que os testes disponíveis para diagnóstico do vírus não diferenciam os Ac's vacinais dos gerados pela infeção natural (Sellon & Hartmann, 2012). Além disso, esta vacina não é totalmente eficaz na proteção contra a infeção pelos subtipos A e D e é ineficaz na maioria dos subtipos europeus (Hosie et al., 2009; Duarte et al., 2012). Os problemas associados ao diagnóstico e à falta de evidência de eficácia da vacina contra os subtipos europeus constituem um entrave à legalização da vacina na Europa (Hosie et al., 2009; ABCD, 2012). Por outro lado, como o FIV apresenta um grande potencial de variação genética, a possibilidade de emergirem novos subtipos torna também questionável a capacidade de proteção da vacina (Dunham & Graham, 2008). Posto isto, é necessário continuar a desenvolver e a testar novas vacinas (Hayward & Rodrigo, 2010).

A aplicação da vacina contra o FIV está recomendada em gatos saudáveis com alto risco de infeção (acesso à rua e/ou coabitação com outros gatos infetados), a partir das oito semanas de

idade. Antes da vacinação, os gatos devem então ser testados, para garantir que são negativos. A primovacinação consiste na administração de três doses por via subcutânea, com duas a três semanas de intervalo, seguida de revacinações anuais (Levy et al., 2008b; Grace, 2011; Maclachlan et al., 2011; Scherk et al., 2013). Os gatos vacinados ganham imunidade por pelo menos doze meses, tendo sido demonstrado que os Ac's induzidos pela vacinação podem persistir por mais de quatro anos em alguns casos (Scherk et al., 2013). Como os testes mais comuns de diagnóstico de FIV não distinguem Ac's vacinais de Ac's produzidos pela infecção natural, alguns autores sugerem a aplicação de um *microchip* ou de uma coleira para identificar os animais vacinados, de forma a evitar que erroneamente sejam submetidos a eutanásia (Levy et al., 2008b; Grace, 2011; Sykes, 2013).

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRA POPULACIONAL EM ESTUDO

Para o desenvolvimento deste trabalho de investigação, foram utilizadas 82 amostras de sangue total de gatos seropositivos para FIV (70 de Portugal continental e 12 dos Açores), cujo estatuto clínico, raça, idade e sexo, não foram considerados para este estudo. Consoante a sua origem, as amostras foram divididas em três grupos: Açores, concelho de Lisboa e Moita (Tabela 2). Estas amostras foram colhidas por vários colegas, no âmbito dos respetivos trabalhos de MIMV, entre os anos de 2008 e 2013, e fazem parte do banco de materiais biológicos do laboratório de Virologia da FMV da UL, tendo sido gentilmente cedidas pelo CIISA.

Tabela 2 – Origem e identificação das amostras.

		Origem das Amostras (nº de amostras; ano de colheita)						
		Açores (12; 2013)	Moita (11; 2011)	Concelho de Lisboa (59)				
				Monsanto (8; 2008)	União Zoófila de Lisboa (51; 2010 – 2011)			
Identificação das Amostras (82 no total; 2008 – 2013)	1Aç	1Moi		13UZ	60UZ	72UZ	85UZ	95UZ
	6Aç	8Moi	33RR*	22UZ	61UZ	73UZ	86UZ	96UZ
	7Aç	9Moi	34RR	31UZ	62UZ	74UZ	87UZ	97UZ
	15Aç	10Moi	51RR	50UZ	63UZ	75UZ	88UZ	98UZ
	16Aç	11Moi	53RR	52UZ	64UZ	76UZ	89UZ	103UZ
	19Aç	12Moi	75RR	53UZ	65UZ	78UZ	90UZ	107UZ
	20Aç	16Moi	81RR	54UZ	66UZ	80UZ	91UZ	108UZ
	73Aç	38Moi	84RR	55UZ	68UZ	81UZ	92UZ	109UZ
	77Aç	39Moi	91RR	56UZ	69UZ	82UZ	93UZ	110UZ
	79Aç	40Moi		59UZ	71UZ	83UZ	94UZ	111UZ
	82Aç	45Moi						112UZ
	86Aç							

Nota. *RR – Ricardo Rosado, autor da Dissertação de Mestrado para a qual foram colhidas as amostras de Monsanto.

O grupo de amostras dos Açores proveio de uma colheita efetuada na Ilha de São Miguel, a gatos errantes com mais de 6 meses (Botelho, 2014). As amostras da Moita foram colhidas na Associação dos Amigos dos Animais Abandonados da Moita (Rodrigues, 2012). As amostras do concelho de Lisboa foram obtidas no Canil Municipal de Lisboa (Monsanto), a partir de gatos submetidos a eutanásia (Rosado, 2009) e na União Zoófila de Lisboa, a partir de gatos errantes, adultos, sem idade definida e de raça Europeu Comum (Cravo, 2011).

2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.1. Extração e purificação de DNA total

A extração de DNA das amostras de sangue total de felídeos foi efetuada recorrendo ao *kit* comercial *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Duesseldorf, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

De uma forma simplificada, o método de extração consiste em duas etapas: lise das proteínas celulares pela adição de proteinase K e precipitação do DNA através da adição de um álcool.

Para cada amostra, adicionou-se 20 µl de proteinase K a 100 µl de sangue total em tubos de 2 ml. O volume foi ajustado a 200 µl por adição de 100 µl de tampão PBS. Após adição de 200 µl de tampão AL desnaturante, a mistura foi homogeneizada e incubada em banho seco, a 56 °C, durante 10 min. A precipitação do DNA foi efetuada por adição de 200 µl de etanol puro e o precipitado transferido para uma coluna de sílica, à qual o DNA ficou adsorvido após centrifugação a 6000 x g, durante 1 min. As lavagens foram efetuadas após substituição do tubo coletor da coluna por um novo tubo, com 500 µl de tampão AW1, seguindo-se nova centrifugação a 20000 x g, durante 3 min. A segunda lavagem foi realizada nas mesmas condições, mas com tampão AW2. O DNA adsorvido na coluna de sílica foi eluído em 200 µl de tampão AE. As amostras de DNA total isolado foram congeladas a -20 °C.

2.2. Avaliação da pureza das amostras

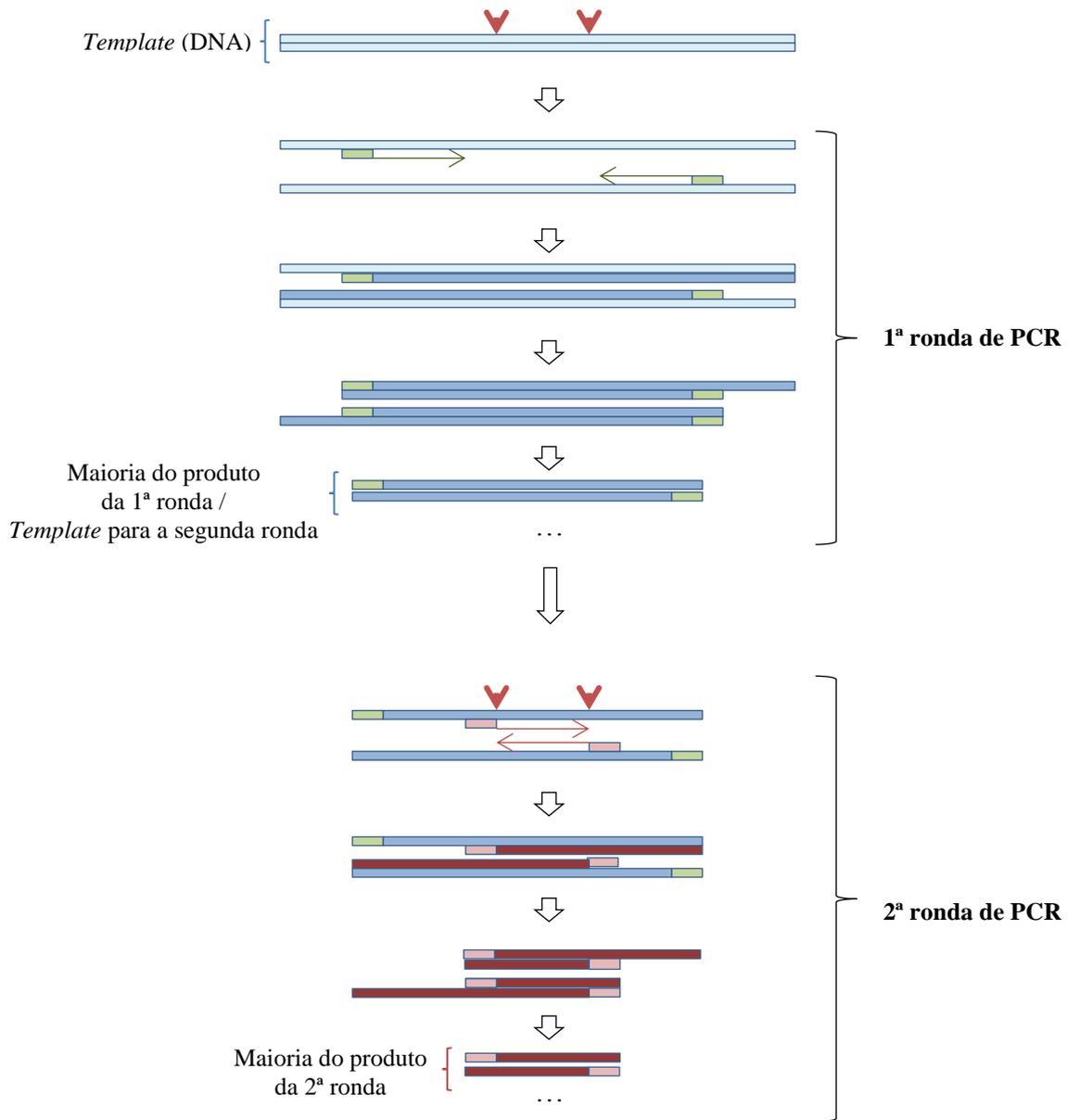
A avaliação da concentração de DNA das amostras foi efetuada no espectrofotómetro *Nanodrop 2000C* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), tendo oscilado entre 10 e 400 ng/µl de solução (anexo 1). Nos casos em que os valores de concentração de DNA se apresentaram muito baixos ou nulos, repetiu-se, sempre que possível, o processo de extração e quantificação.

2.3. Detecção de DNA proviral e amplificação da região V3-V5 do gene *env*, através de *Nested-PCR*

As amostras foram submetidas a um *Nested-PCR* (Figura 8), que consiste em duas reações ou rondas de PCR consecutivas, recorrendo à utilização de dois pares de *primers*, um para cada ronda. O produto da primeira ronda serve de molde (*template*) para a segunda, na qual é amplificada a sequência alvo, um fragmento interno da região amplificada pelo primeiro conjunto de *primers*. Desta forma, consegue-se amplificar sequências virais que, numa fase

inicial, se encontravam em concentrações muito baixas na amostra, o que confere sensibilidade e especificidade à técnica.

Figura 8 – Esquema representativo de um *Nested-PCR*.



Legenda:

- ▼ ▼ – sequência alvo;
- ■ – 1º par de primers (primers da 1ª ronda de PCR);
- ■ – 2º par de primers (primers da 2ª ronda de PCR).

O fragmento de DNA escolhido como alvo para amplificação inclui a região V3-V5 do gene *env*. As características dos *primers* utilizados neste *Nested-PCR* encontram-se resumidas na Tabela 3. Na primeira ronda, os *primers* Env1 (GCTCAGGTAGTATGGAGACT) e Env2 (ACTTCATCATTCTCCTCTT) amplificam um produto de 2048 bp (Duarte, Marques, Tavares & Fevereiro, 2002; Duarte & Tavares, 2006). Os *primers* da segunda ronda, denominados HDfor (ATACCAAATGTGGATGGTG) e HDrev (CAAGACCAATTTCCAGCAAT), originam um produto de 550 bp (Bachmann et al., 1997; Duarte et al., 2002; Reggeti & Bienzle, 2004; Duarte & Tavares, 2006; Weaver, 2010).

Tabela 3 – *Primers* utilizados no *Nested-PCR*.

Primer	Sequência (5'→3')	Gene/ região alvo	Localização nucleotídica (nt)	Tamanho do amplificação (bp)
Env 1	GCTCAGGTAGTATGGAGACT ^a	Gene <i>env</i> ^a	6788–6807 ^a	2048 ^a
Env 2	ACTTCATCATTCTCCTCTT ^a		8836–8817 ^a	
HDfor	ATACCAAATGTGGATGGTG ^b	Região V3-V5 do gene <i>env</i> ^b	7316–7335 ^b	550 ^b
HDrev	CAAGACCAATTTCCAGCAAT ^b		7866–7847 ^b	

Nota. ^aDuarte et al., 2002; Duarte & Tavares, 2006); ^bBachmann et al., 1997; Duarte et al., 2002; Reggeti & Bienzle, 2004; Duarte & Tavares, 2006; Weaver, 2010.

De uma forma geral, seguiu-se o protocolo de amplificação que consta na Tabela 4, embora em determinadas amostras tenha sido necessário otimizar as condições de amplificação, em função dos resultados obtidos, com destaque para a diminuição da temperatura de *annealing* para 40/45°, redução do tempo de extensão para 1min ou 45 seg e aumento do número de ciclos para 35. A diminuição da temperatura de *annealing* diminui a especificidade de ligação do *primer* à sequência alvo, facilitando o emparelhamento. A redução do tempo de extensão minimiza a possibilidade de amplificações inespecíficas. O número de ciclos foi aumentado para reações cujo *template* inicial continha pouco DNA, com o objetivo de obter maior concentração de produto final e desta forma visualizar o produto de amplificação no gel de eletroforese.

Tabela 4 – Programa de amplificação do termociclador para as duas rondas de PCR.

94°C (a), durante 1 minuto	
50°C (b), durante 1 minuto	5 ciclos
68°C (c), durante 2 minutos (d)	
68°C, durante 5 minutos	
94°C (a), durante 15 segundos	
55°C (b), durante 45 segundos	30 ciclos
68°C (c), durante 2 minutos (1 minuto na 2ª ronda) (d)	
68°C, durante 5 minutos	

Nota. (a) Temperatura de desnaturação – temperatura à qual as cadeias duplas de DNA se separam, originando cadeias simples; (b) Temperatura de *annealing* – temperatura ideal à qual *primer* e *template* se ligam; exclusivamente dependente do comprimento e sequência do *primer*; (c) Temperatura de extensão – temperatura à qual a Taq polimerase replica a cadeia de DNA; (d) Tempo de extensão – relacionado com a dimensão do produto amplificado.

As primeiras rondas de PCR foram realizadas num volume final (Vf) de 50µl, contendo 20µl de 5 *PRIME MasterMix* a 2,5x³ (5PRIME GmbH, Reino Unido), 1µl de cada *primer* (Env1 e Env2), ambos a 50pmol/µl⁴, e 50ng de DNA genómico como *template*.

Para cada reação de PCR foi realizado um controlo negativo, no qual o DNA foi substituído por água purificada em sistema *Milli-Q*.

As segundas rondas de PCR foram executadas segundo o protocolo apresentado na Tabela 4, usando como *template* 5µl do produto da primeira ronda.

Os produtos do *Nested-PCR* foram observados em gel de agarose, após eletroforese horizontal e coloração com *GelRed*.

2.4. Eletroforese em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado

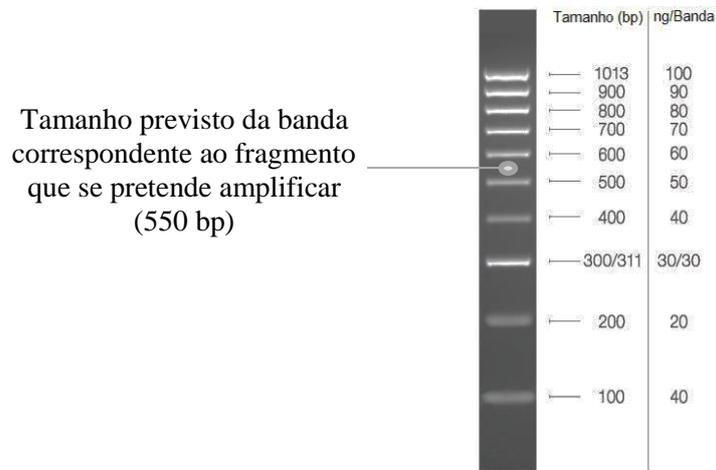
Os fragmentos amplificados pelo *Nested-PCR* foram sujeitos a eletroforese horizontal, em gel de agarose a 1,5%, com uma corrente constante de 90 Volts, durante cerca de uma hora e meia.

Para permitir a identificação da banda de interesse, correspondente a um fragmento de 550 bp (região V3-V5 do gene *env*), em cada gel, foi corrido em paralelo o marcador de pesos moleculares *HyperLadder II* (BioLine, Londres, Reino Unido) (Figura 9).

³ 20µl de 5 *PRIME MasterMix* a 2,5x num Vf de 50µl corresponde a uma concentração de 1x, contendo 1,5mM de Magnésio (Mg²⁺), 50µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) e 1,25U de Taq DNA polimerase.

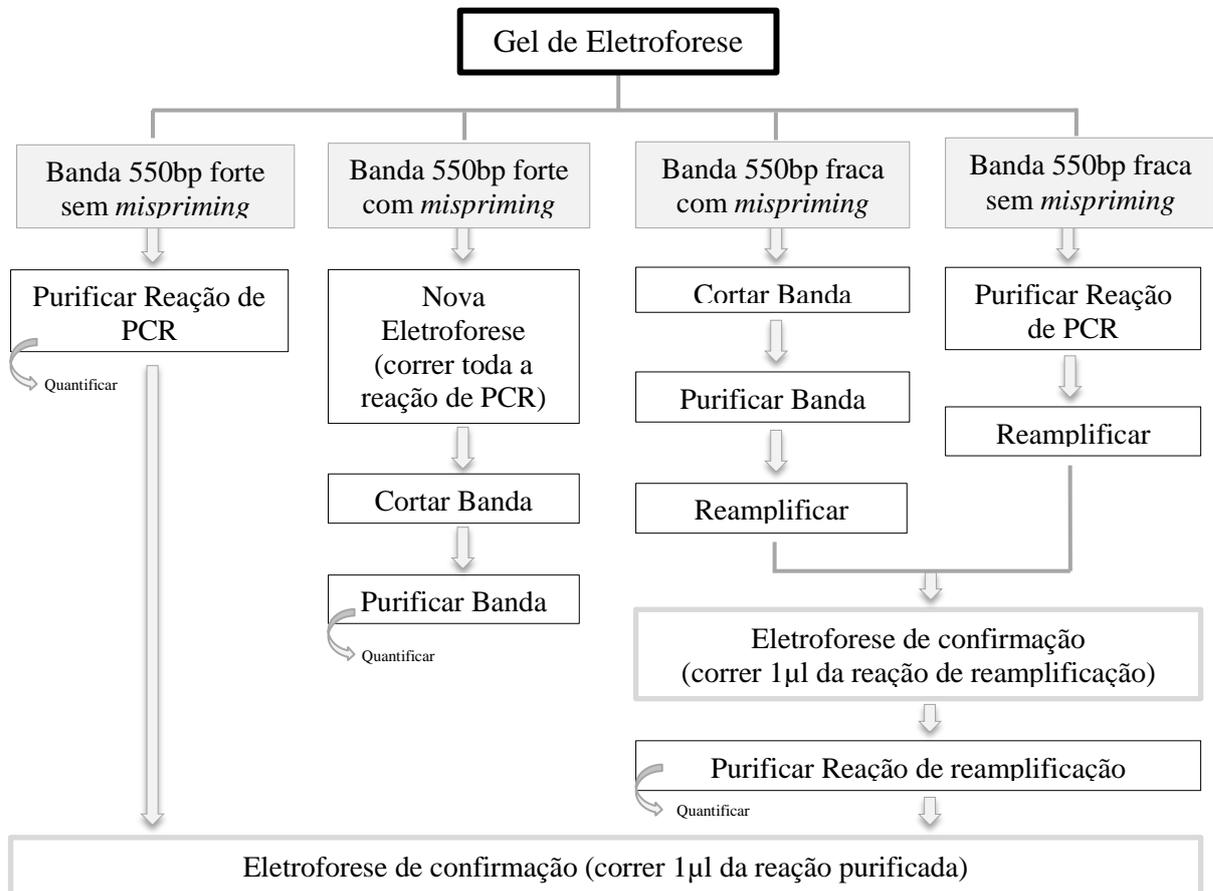
⁴ As soluções-mãe de ambos os *primers* encontravam-se a 200 pmol/µl. Foi feita uma diluição de 1:4. 1 µl de *primer* a 50 pmol/µl correspondendo a uma concentração de 1 pmol/µl num Vf de 50 µl da reação de PCR.

Figura 9 – Marcador de pesos moleculares utilizado nas corridas de eletroforese, adaptado de <http://www.bioline.com/us/hyperladder-100bp.html>.



Após a corrida, os géis foram visualizados no transiluminador de radiação UV *ImageMaster* (Pharmacia, New York City, NY, EUA) e registados em formato digital. A metodologia seguinte dependeu do tipo de banda identificada (Figura 10).

Figura 10 – Esquema representativo das etapas que se seguem à visualização do gel de eletroforese, consoante o tipo de banda identificada.



Na presença de uma única banda de forte intensidade, correspondente ao fragmento de 550 bp, procedeu-se à purificação direta do produto do *nested-PCR*, com o *kit* comercial *DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA), seguindo as indicações do fabricante.

Nos casos de *mispriming*, os géis apresentam mais que uma banda associadas a um mesmo poço, refletindo a amplificação de produtos inespecíficos. Na presença de uma banda de 550 bp de fraca intensidade associada a *mispriming*, procedeu-se à excisão da mesma. O fragmento do gel obtido foi purificado com o *kit* comercial *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, para posterior reamplificação. Nos casos de *mispriming* com a banda de interesse de forte intensidade, foi corrido num novo gel a totalidade das reações de PCR, para posterior corte e purificação da banda.

Na presença da banda de interesse ténue (baixo rendimento do produto desejado) sem evidência de *mispriming*, o produto do *nested-PCR* foi diretamente purificado para posterior reamplificação.

Para as amostras cujos géis de agarose não evidenciaram qualquer banda (ausência de amplificação), repetiu-se, sempre que possível, o *nested-PCR*.

2.5. Extração e purificação de DNA a partir de géis de agarose

A extracção e purificação de produtos de PCR a partir de géis de agarose foram efetuadas recorrendo ao *kit* comercial *Zymoclean Gel DNA Recovery* (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para purificação direta de produtos de PCR, utilizou-se o *kit* comercial *DNA Clean & Concentrator* (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, EUA), seguindo igualmente as indicações do fabricante.

Após purificação das bandas e das reações de PCR, o DNA adsorvido nas colunas de sílica foi eluído em 20µl de *DNA Elution Buffer* e seguidamente quantificado, para verificar se a concentração era suficiente para se proceder à sequenciação. Para todas as amostras purificadas, foi corrido um gel de eletroforese de confirmação, usando 1µl de *template*.

2.6. Sequenciação e análise filogenética

As amostras dos produtos de PCR purificados foram preparadas e enviadas, juntamente com os *primers*, para sequenciação pelo método de Sanger (STABVida, Portugal).

As novas sequências nucleotídicas foram sujeitas a uma pesquisa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) na base de dados do NCBI (*National Center for*

Biotechnology Information) – *Genbank* – a partir da qual se registaram alguns dos números de acesso obtidos, com percentagens de identidade não inferiores a 85%. A partir dos números de acesso foram obtidas as sequências nucleotídicas correspondentes.

No programa *CLC Workbench* (CLC Bio, Aarhus, Denmark), recorrendo ao algoritmo *ClustalW* (Thompson, Higgins & Gibson, 1994), foi efetuado o alinhamento (anexo 2) das 49 sequências em estudo com as 56 sequências de FIV obtidas no *Genbank*. Para além destas, foram incluídas no alinhamento 11 sequências previamente subtipificadas, de forma a garantir a inclusão dos 6 subtipos na árvore filogenética. O alinhamento foi corrigido manualmente para maximizar as semelhanças genéticas. Para estimar as relações filogenéticas entre as novas sequências portuguesas e as obtidas no *Genbank* (56 + 11), foi construída uma árvore filogenética sem raiz pelo método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com base no cálculo das distâncias genéticas entre pares de sequências pelo método *Kimura two-parameter* (Kimura, 1980). A robustez do agrupamento filogenético foi avaliada por análise de *bootstrap* de 1000 repetições.

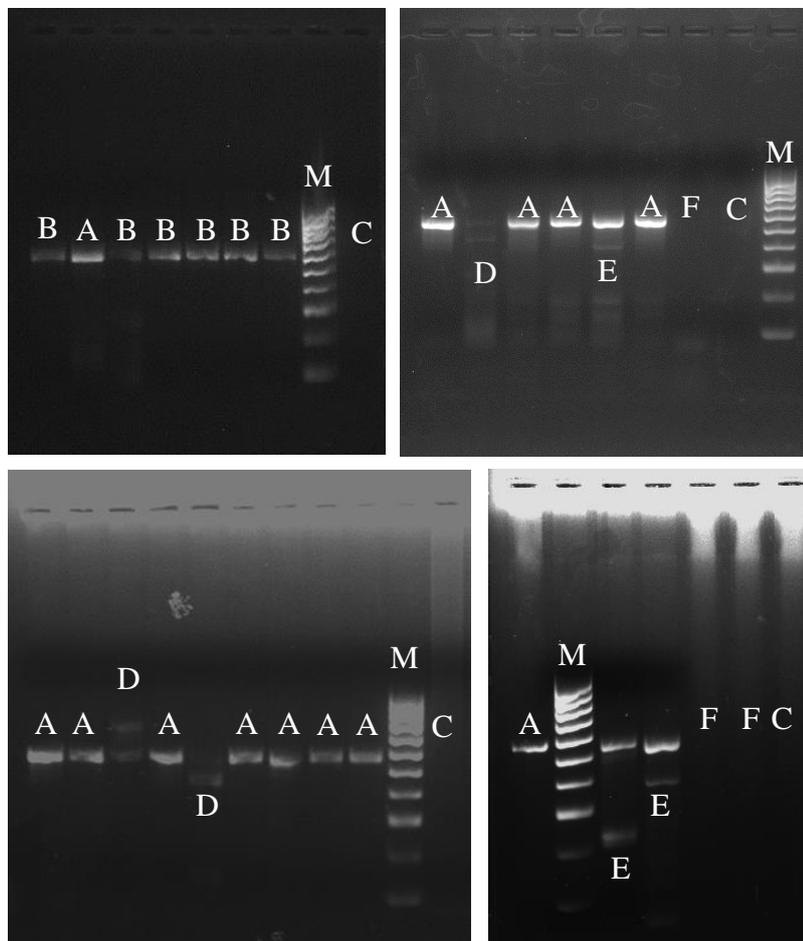
O alinhamento nucleotídico obtido no programa *CLC Workbench* foi exportado para o programa *MEGA6* (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar, 2013). Através deste *software*, obteve-se pelo método *Kimura two-parameter*, uma matriz triangular de distâncias genéticas e identidades percentuais, que foi exportada para o *Excel* para o cálculo dos valores máximo e mínimo e da média para as distâncias genéticas dentro de cada subtipo e entre subtipos, de forma a averiguar a subtipificação das novas sequências portuguesas.

IV. RESULTADOS

1. AMPLIFICAÇÃO DA V3-V5 DO GENE *env*

Num total de 82 amostras processadas, 33 apresentaram uma amplificação ineficiente, sem deteção de produto na eletroforese (51RR, 53RR, 13UZ, 22UZ, 50UZ, 63UZ, 66UZ, 69UZ, 73UZ, 82UZ, 83UZ, 85UZ, 86UZ, 87UZ, 89UZ, 90UZ, 91UZ, 92UZ, 94UZ, 95UZ, 96UZ, 97UZ, 107UZ, 1Moi, 8Moi, 9Moi, 12Moi, 38Moi, 39Moi, 16Aç, 20Aç, 77Aç e 79Aç). Nas restantes 49 amostras foi possível amplificar o fragmento de 550 bp pretendido (33RR, 34RR,

Figura 11 – Visualização de géis de eletroforese no transiluminador.



Legenda:

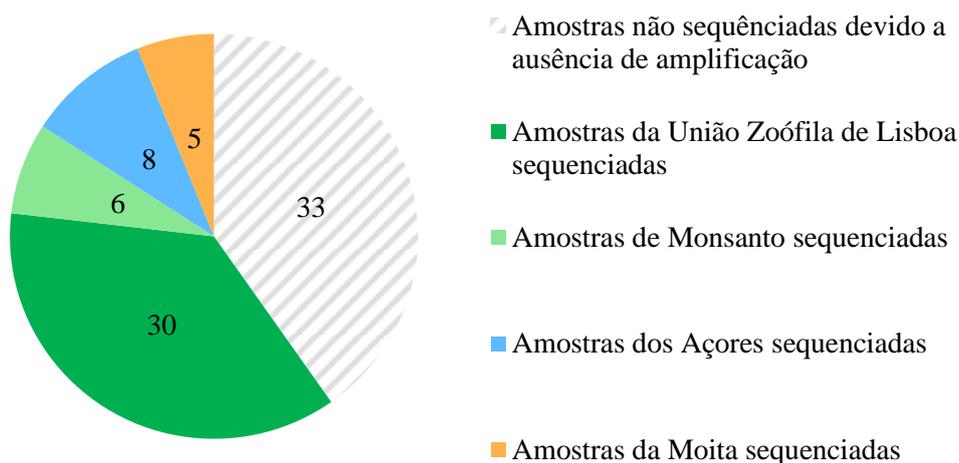
- A – amplificação eficiente: banda de 550 bp de forte intensidade, sem *mispriming*;
- B – banda de 550 bp ténue, sem *mispriming*;
- C – controlo negativo;
- D – banda de 550 bp ténue, com *mispriming*;
- E – banda de 550 bp de forte intensidade, com *mispriming*;
- F – ausência de amplificação;
- M – marcador de pesos moleculares de 100 bp.

75RR, 81RR, 84RR, 91RR, 31UZ, 52UZ, 53UZ, 54UZ, 55UZ, 56UZ, 59UZ, 60UZ, 61UZ, 62UZ, 64UZ, 65UZ, 68UZ, 71UZ, 72UZ, 74UZ, 75UZ, 76UZ, 78UZ, 80UZ, 81UZ, 88UZ, 93UZ, 98UZ, 103UZ, 108UZ, 109UZ, 110UZ, 111UZ, 112UZ, 10Moi, 11Moi, 16Moi, 40Moi, 45Moi, 1Aç, 6Aç, 7Aç, 15Aç, 19Aç, 73Aç, 82Aç e 86Aç).

2. SEQUENCIAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foi possível obter a sequenciação nucleotídica da totalidade de amostras enviadas para o efeito: 36 amostras do concelho de Lisboa (33RR, 34RR, 75RR, 81RR, 84RR, 91RR, 31UZ, 52UZ, 53UZ, 54UZ, 55UZ, 56UZ, 59UZ, 60UZ, 61UZ, 62UZ, 64UZ, 65UZ, 68UZ, 71UZ, 72UZ, 74UZ, 75UZ, 76UZ, 78UZ, 80UZ, 81UZ, 88UZ, 93UZ, 98UZ, 103UZ, 108UZ, 109UZ, 110UZ, 111UZ e 112UZ), 5 amostras da Moita (10Moi, 11Moi, 16Moi, 40Moi e 45Moi) e 8 amostras dos Açores (1Aç, 6Aç, 7Aç, 15Aç, 19Aç, 73Aç, 82Aç e 86Aç) (Figura 12).

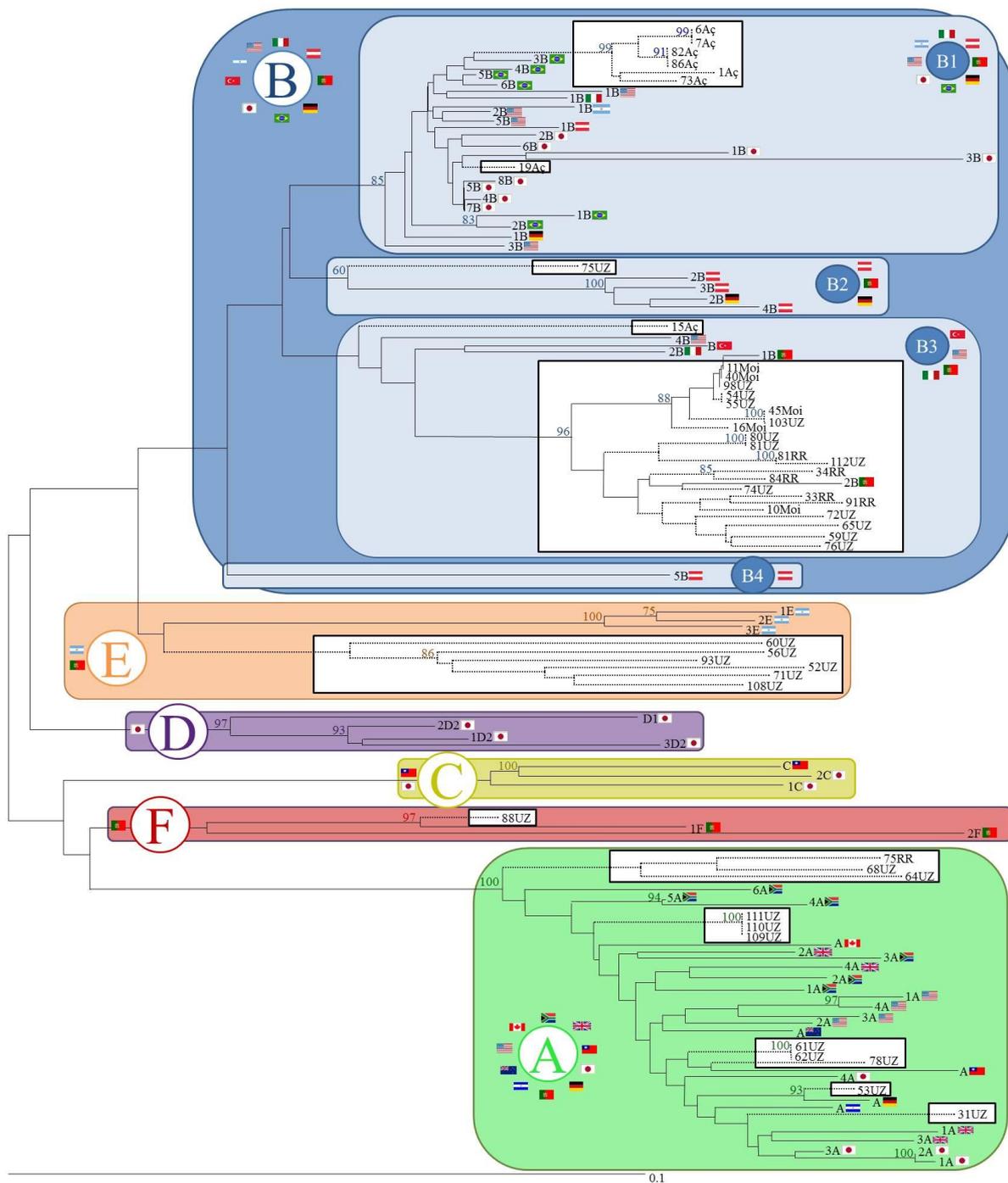
Figura 12 – Gráfico representativo da amostra populacional em estudo.



Nota. A origem das amostras está identificada por cores. A cor verde (verde escuro e verde claro) corresponde às amostras do concelho de Lisboa.

As 49 novas sequências portuguesas foram alinhadas com algumas das sequências resultantes da pesquisa BLAST e com as sequências protótipo dos 6 subtipos de FIV. Tendo em conta o elevado número de sequências incluídas no alinhamento (116), obteve-se uma árvore filogenética complexa (Figura 13). Para facilitar a sua leitura, os números de acesso das sequências obtidas na base de dados e das sequências de referência foram substituídos por códigos mais simples (anexo 3), que combinam o subtipo do isolado com o local onde foi identificado (número/subtipo/bandeira do país: exemplo: 1F 🇵🇹).

Figura 13 – Árvore filogenética *Neighbor-Joining*, evidenciando os subtipos e subgrupos B identificados.



Nota. São apenas salientados os valores de *bootstrap* superiores a 70%, embora não tenha sido eliminado um valor de 60% numa das ramificações do subtipo B, para enfatizar a subdivisão correspondente ao subgrupo B2.

As letras, de A a F, indicam os subtipos, separados por cores (A: verde; B: azul; C: amarelo; D: roxo; E: laranja; F: vermelho). B1, B2, B3 e B4 representam subgrupos dentro do subtipo B.

Os códigos de acesso correspondentes às sequências obtidas no *Genbank* encontram-se no anexo 3.

Os retângulos a branco realçam as novas sequências portuguesas.

A topologia da árvore filogenética sugere a distribuição das novas sequências portuguesas por 4 subtipos (A, B, E e F) com distinção de 4 subgrupos dentro do subtipo B: B1, B2, B3 e B4.

Tabela 5 – Distâncias genéticas dentro dos subtipos e entre subtipos diferentes.

SUBTIPOS \bar{x} (<i>mín</i> – <i>máx</i>)	A	B	C	D	E	F
A	0,070 (0,018 – 0,131)					
B	0,235 (0,164 – 0,323)	0,106 (0,005 – 0,207)				
C	0,271 (0,221 – 0,507)	0,221 (0,172 – 0,273)	0,104 (0,100 – 0,106)			
D	0,245 (0,206 – 0,288)	0,179 (0,120 – 0,243)	0,224 (0,198 – 0,250)	0,095 (0,003 – 0,164)		
E	0,264 (0,179 – 0,328)	0,174 (0,145 – 0,216) [sem inclusão das amostras portuguesas: 0,172 (0,216 – 0,147)]	0,249 (0,216 – 0,277)	0,199 (0,169 – 0,233)	0,183 (0,163 – 0,208)	
F	0,224 (0,191 – 0,257)	0,212 (0,150 – 0,292)	0,220 (0,191 – 0,237)	0,197 (0,157 – 0,247)	0,210 (0,142 – 0,287)	0,150 (0,050 – 0,204)

Nota. Os valores apresentados incluem as novas amostras portuguesas, previamente subtipificadas, e foram obtidos no programa *Excel*, após exportação da matriz de distâncias genéticas do programa *MEGA6*. \bar{x} – valor da média de distâncias genéticas ; *mín* – valor mínimo de distância genética; e *máx* – valor máximo de distância genética.

Os valores médios de distâncias genéticas dentro dos subtipos foram 0.070, 0.106, 0.104, 0.095, 0.183 e 0.150 para os subtipos A, B, C, D, E e F, respetivamente. Entre subtipos diferentes os valores foram mais elevados, tendo-se registado um mínimo de 0.174 (entre E e B) e máximo de 0.271 (entre A e C) (Tabela 5). Considerando apenas os subtipos que incluíram sequências portuguesas, o valor máximo de distância genética entre subtipos registado foi de 0.264, entre os subtipos A e E.

Tabela 6 – Distribuição das novas sequências portuguesas por subtipos.

	Subtipos							
	A (11)	B (31)					E (6)	F (1)
		B1 (7)	B2 (1)	B3 (23)				
Novas sequências portuguesas (49)		1Aç	75UZ	54UZ	81UZ	91RR	88UZ	
	31UZ	6Aç		55UZ	98UZ	15Aç		
	53UZ	7Aç		59UZ	103UZ	10Moi		
	57UZ	19Aç		65UZ	112UZ	11Moi		
	61UZ	73Aç		72UZ	33RR	16Moi		
	62UZ	82Aç		74UZ	34RR	40Moi		
	64UZ	86Aç		76UZ	81RR	45Moi		
	68UZ			80UZ	84RR			

O subtipo B (Figura 15) é o que reúne maior número de sequências portuguesas (Figura 14), sendo o único a incluir amostras das três zonas geográficas processadas (Açores, Lisboa e Moita) (Tabela 6).

Figura 14 – Gráfico representativo das percentagens de novas sequências em cada subtipo.

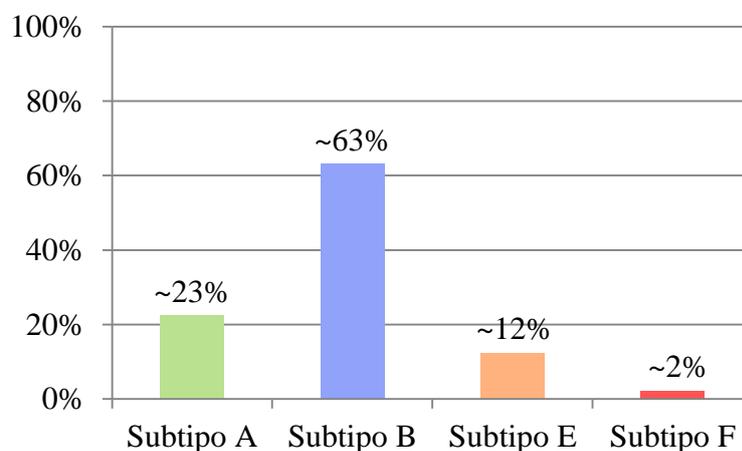
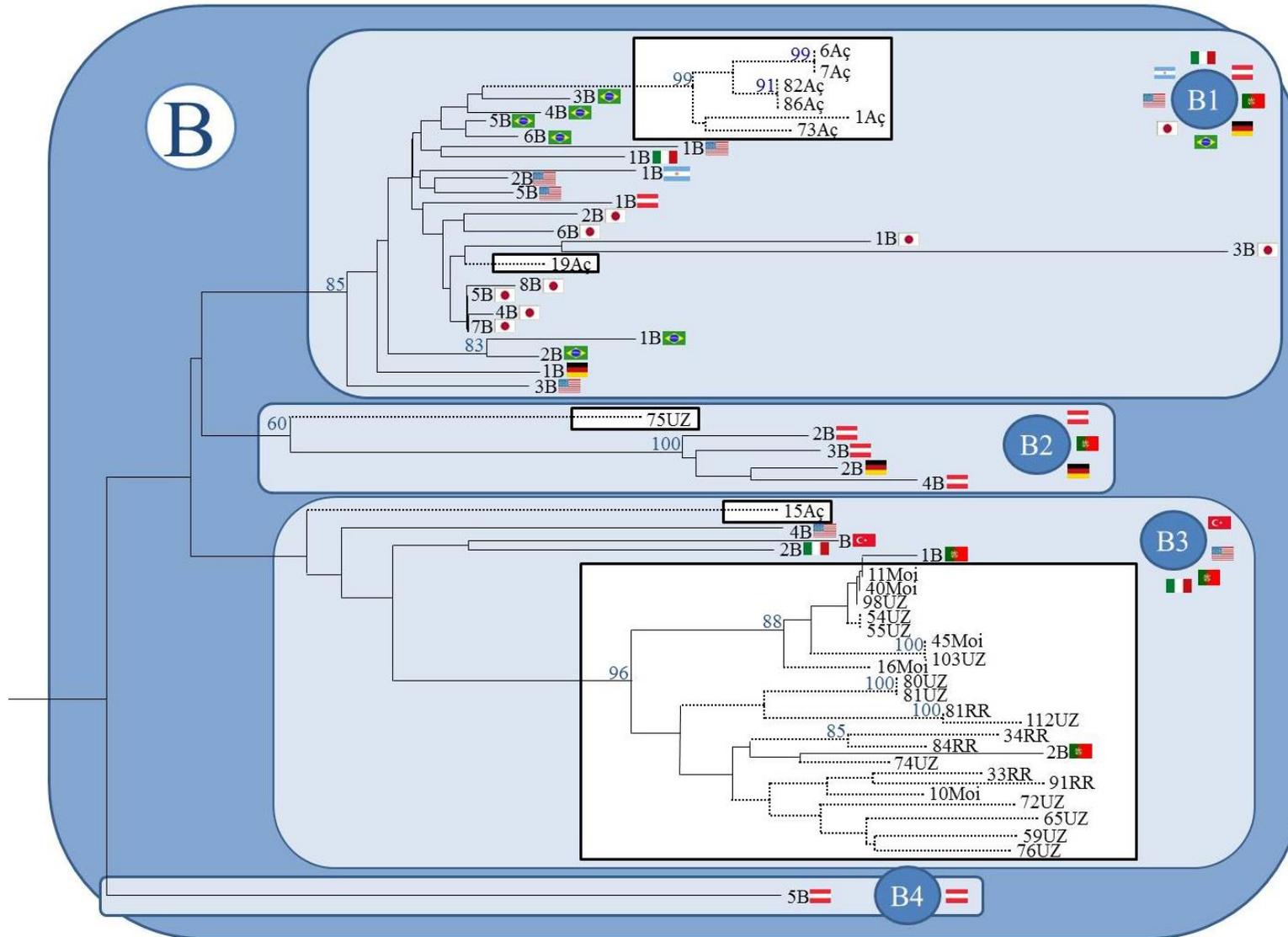


Figura 15 – Ampliação da árvore *Neighbor-Joining*, pormenor do subtipo B.



O subtipo B é portanto o que apresenta maior heterogeneidade, com um intervalo de distâncias genéticas entre as sequências que o compõem claramente superior ao de qualquer outro subtipo (0.005 – 0.207) (Tabela 5).

A organização dos ramos que compõem o subtipo B sugere a divisão do mesmo em 4 subgrupos (B1, B2, B3 e B4) (Figura 15). As novas sequências portuguesas que agruparam com sequências protótipo deste subtipo distribuem-se por três subgrupos – B1, B2 e B3 – sendo o subgrupo B4 composto por uma única sequência, da Áustria. Os subgrupos B1 e B2 são os que apresentam valores de *bootstrap* mais significativos (85% e 60%, respetivamente). A média de distância genética entre sequências incluídas no subtipo B é de 0.106, inferior aos valores mais elevados observados entre subgrupos (Tabela 7).

Tabela 7 – Distâncias genéticas dentro dos subgrupos B e entre subgrupos B.

Subgrupos do subtipo B \bar{x} (<i>mín</i> – <i>máx</i>)	B1	B2	B3	B4
B1	0,054 (0,010 – 0,128)			
B2	0,109 (0,072 – 0,189)	0,095 (0,087 – 0,107)		
B3	0,118 (0,084 – 0,207)	0,135 (0,100 – 0,159)	0,081 (0,005 – 0,127)	
B4	0,122 (0,100 – 0,172)	0,135 (0,126 – 0,140)	0,158 (0,138 – 0,190)	0*

Nota. Os valores que constam nesta tabela foram calculados no *Excel*, a partir da exportação da matriz triangular de distâncias genéticas obtida no *MEGA6*. *B4 é composto por uma única amostra. \bar{x} – valor da média de distâncias genéticas; *mín* – valor mínimo de distância genética; *máx* – valor máximo de distância genética.

O subgrupo B1 destaca-se com o valor mais alto de *bootstrap* (85%), incluindo, para além das sequências já subtipificadas, todas as amostras dos Açores, com exceção da 15Aç. Neste subgrupo, é evidente um conjunto de seis amostras dos Açores (6Aç, 7Aç, 82Aç, 86Aç, 1Aç, 73Aç) que deriva de um ramo suportado por um valor de *bootstrap* de 99%. Estas seis sequências apresentam uma forte similaridade entre si, com um valor máximo de distâncias genéticas de 0.057 (Tabela 8).

Tabela 8 – Distâncias genéticas entre as amostras dos Açores do subgrupo B1.

Amostras	19Aç	6Aç	7Aç	82Aç	86Aç	1Aç	73Aç	15 Aç
19Aç								
6Aç	0,057							
7Aç	0,057	0,000						
82Aç	0,054	0,013	0,013					
86Aç	0,054	0,013	0,013	0,000				
1Aç	0,057	0,031	0,031	0,023	0,023			
73Aç	0,054	0,023	0,023	0,016	0,016	0,023		
15Aç	0,098	0,100	0,100	0,097	0,097	0,103	0,090	

Média:
0,028

Máx:
0,057

Neste conjunto de seis amostras do subgrupo B1 identificam-se ainda dois pequenos grupos, cada um deles composto por duas sequências, suportados por valores de *bootstrap* significativos (91 e 99%). A análise das distâncias genéticas dentro de cada grupo revela que as amostras que os compõem (6Aç e 7Aç num e 82Aç e 86Aç noutro) apresentam sequências iguais (distância genética = 0.000; identidade = 100%). Por outro lado, os dois aglomerados são também muito próximos, apresentando apenas 13% de divergência nucleotídica entre as sequência de um e de outro (Figura 16).

Figura 16 – Alinhamento das sequências nucleotídicas (550 bp) dos Açores que formam aglomerados no subgrupo B1.

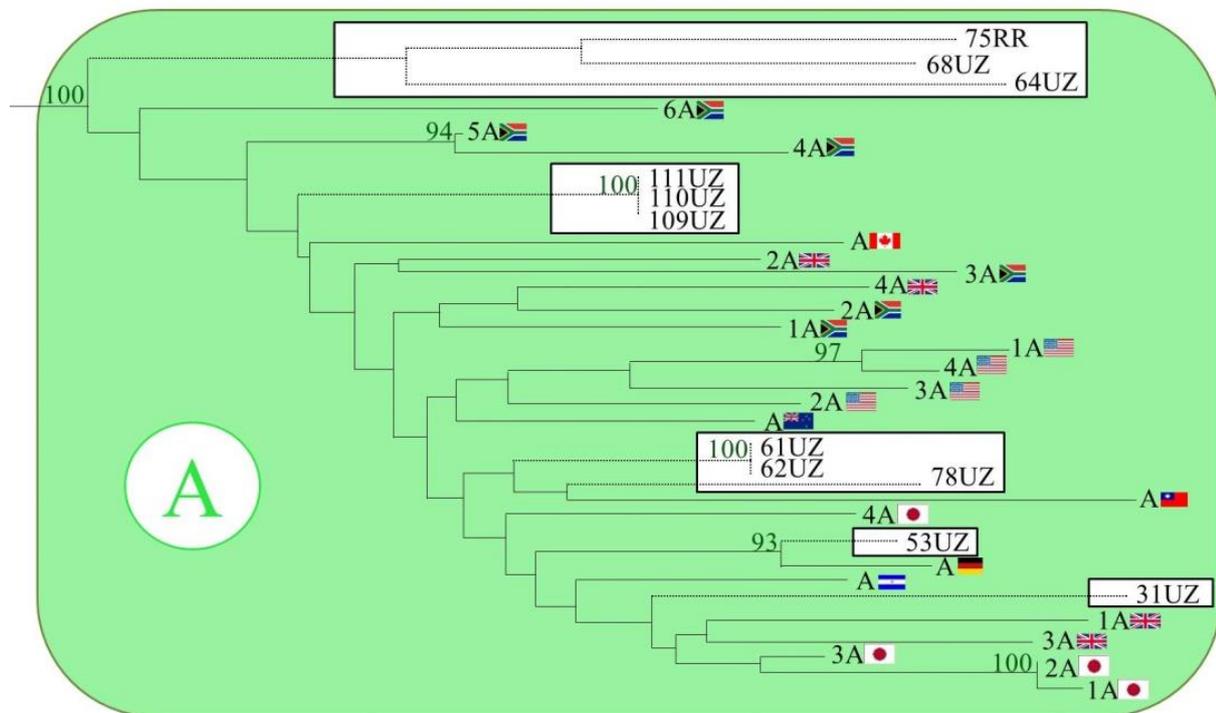


No subtipo B2 foi apenas incluída uma das novas sequências portuguesas, 75UZ, que, embora isolada, emerge paralelamente a um ramo com *bootstrap* 100% de onde derivam 4 sequências previamente caracterizadas. Estes dois ramos compõem o subtipo B2 e partem de um ramo comum suportado por um valor de *bootstrap* considerável (60%).

O subgrupo B3 é o subgrupo com maior número de sequências portuguesas, sendo o único a incluir amostras das diferentes localizações em estudo: uma amostra dos Açores (15Aç), cinco amostras da Moita (10Moi, 11Moi, 16Moi, 40Moi e 45Moi) e dezassete amostras do concelho de Lisboa (33RR, 34RR, 81RR, 84RR, 91RR, 54UZ, 55UZ, 59UZ, 65UZ, 72UZ, 74UZ, 76UZ, 80UZ, 81UZ, 98UZ, 103UZ e 112UZ). As amostras da Moita e do concelho de Lisboa deste subgrupo apresentam um ramo comum com 2 sequências portuguesas já caracterizadas, suportado por um notável valor de *bootstrap* (96%). A amostra dos Açores (15Aç) é menos próxima das amostras do continente, surgindo num ramo mais isolado.

O ramo que sustenta o subtipo A apresenta um *bootstrap* de 100% (Figura 17). Este subtipo inclui um número considerável de novas sequências portuguesas (11), embora todas do concelho de Lisboa (UZL (31UZ, 53UZ, 61UZ, 62UZ, 64UZ, 68UZ, 78UZ, 109UZ, 110UZ, 111UZ e 75RR).

Figura 17 – Ampliação da árvore *Neighbor-Joining*, pormenor do subtipo A.



O subtipo A, à semelhança do que foi observado no subgrupo B1, apresenta dois pequenos grupos (de duas e três amostras da UZL) suportados por valores de *bootstrap* de 100%. As amostras 61UZ e 62UZ, que formam um dos grupos, apresentam sequências nucleotídicas

praticamente iguais, tal como as amostras 109UZ, 110UZ e 111UZ (Figura 18). A proximidade genética entre os dois grupos é também evidente.

Figura 18 – Alinhamento das seqüências nucleotídicas (550 bp) da UZL que formam aglomerados no subtipo A.



Todas as seqüências do subtipo A revelaram valores baixos de distâncias genéticas entre si (Tabela 9), sendo este o subtipo que apresenta o valor médio de distâncias genéticas mais baixo (0.070).

Tabela 9 – Distâncias genéticas entre as novas sequências portuguesas do subtipo A.

	75RR	68UZ	64UZ	109UZ	111UZ	110UZ	61UZ	62UZ	78UZ	53UZ	31UZ
75RR											
68UZ	0,048										
64UZ	0,081	0,073									
109UZ	0,069	0,072	0,114								
111UZ	0,069	0,072	0,114	0,000							
110UZ	0,069	0,072	0,114	0,000	0,000						
61UZ	0,081	0,063	0,107	0,063	0,063	0,063					
62UZ	0,081	0,063	0,107	0,063	0,063	0,063	0,000				
78UZ	0,084	0,072	0,098	0,083	0,083	0,083	0,046	0,046			
53UZ	0,085	0,076	0,111	0,064	0,064	0,064	0,058	0,058	0,071		
31UZ	0,057	0,060	0,098	0,072	0,072	0,072	0,066	0,066	0,075	0,066	

Nenhuma das novas sequências portuguesas em estudo agrupou com sequências do subtipo C ou D.

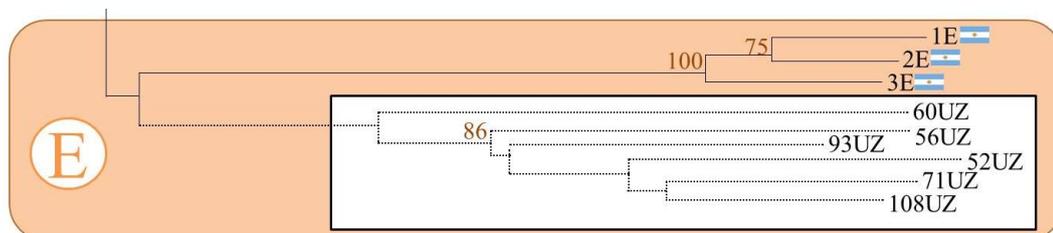
Uma das amostras da UZL (88UZ) agrupou com as duas sequências protótipo do subtipo F. O subtipo F é exclusivamente composto por sequências portuguesas, uma nova e duas já caracterizadas. As sequências já caracterizadas do subtipo F, quando comparadas entre si, apresentam valores de distância genética superiores aos que são observados entre as mesmas e a nova sequência da UZL (Tabela 10).

Tabela 10 – Distâncias genéticas entre sequências do subtipo F.

Identificação do isolado	1F 	2F 	88UZ
1F 			
2F 	0,181		
88UZ	0,054	0,177	

Seis amostras da UZL (52UZ, 56UZ, 60UZ, 78UZ, 93UZ e 108UZ) agruparam com sequências protótipo do subtipo E. No conjunto de nove sequências que constituem este subtipo, distinguem-se dois ramos principais, um de onde divergem as seis amostras da UZL e outro, com *bootstrap* de 100%, que inclui três amostras da Argentina já caracterizadas (Figura 19).

Figura 19 – Ampliação da árvore *Neighbor-Joining*, pormenor do subtipo E.



O ramo que inclui as amostras portuguesas divide-se, por sua vez, noutros dois ramos, um deles, suportado por um *bootstrap* de 86%, incluindo cinco amostras, e o outro composto apenas por uma.

O valor médio de distâncias genéticas observado entre as nove sequências que compõem o subtipo E é de 18,3% (Tabela 11). As seis amostras portuguesas, quando comparadas entre si, apresentam um valor máximo de distância genética mais baixo (13,8%), sendo por isso mais próximas entre si que das sequências já caracterizadas do mesmo subtipo.

Tabela 11 – Percentagens de divergência nucleotídica entre sequências do subtipo E.

Identificação do isolado	1E 	2E 	3E 	60UZ	71UZ	108UZ	93UZ	56UZ	52UZ								
1E 																	
2E 	3,40%																
3E 	4,30%	5,10%															
60UZ	19,8%	18,1%	19,7%														
71UZ	19,3%	20,8%	18,7%	12,1%													
108UZ	16,8%	17,8%	16,3%	12,1%	5,7%												
93UZ	17,1%	18,6%	16,6%	12,0%	6,3%	8,1%											
56UZ	16,9%	18,0%	18,4%	13,0%	9,7%	9,7%	9,0%										
52UZ	18,3%	19,0%	18,7%	13,8%	8,1%	6,6%	10,7%	11,7%									
% Divergência nucleotídica entre os dois grupos (sequências caracterizadas e sequências portuguesas)				% Divergência nucleotídica entre sequências portuguesas													
Média			Mínimo			Máximo			Média			Mínimo			Máximo		
18,3			16,3			20,8			9,9%			5,7%			13,8%		

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo a subtipificação filogenética de sequências de FIV, amplificadas a partir de amostras de sangue de animais seropositivos.

Após sequenciação, a amostra populacional inicial de 82 animais ficou reduzida a 49 sequências: 36 do concelho de Lisboa (UZL e Monsanto), 5 da Moita e 8 dos Açores. A impossibilidade de amplificação e sequenciação de 33 amostras poderá estar relacionada com o facto de as mesmas já não terem chegado ao laboratório nas melhores condições. Por outro lado, algumas destas amostras eram antigas, podendo o tempo de conservação ter sido responsável pela degradação do material genético. É possível também que os *primers* utilizados na amplificação do fragmento de 550 bp, desenvolvidos e desenhados em 1994, por Sodora e seus colaboradores, estejam desatualizados, devido à elevada diversidade genética do FIV.

Como as amostras foram obtidas exclusivamente a partir de gatos seropositivos, este estudo não permite avaliar a prevalência serológica de FIV nas áreas geográficas nele incluídas e as amostras de felinos seropositivos do concelho de Lisboa e da Moita poderão não refletir as características epidemiológicas da população felina de Portugal Continental infetada por FIV. Da mesma forma, as amostras dos Açores, para além de serem, em número, pouco significativas, foram colhidas exclusivamente numa ilha (S. Miguel), pelo que poderão não ser representativas da população de gatos infetados por FIV no arquipélago em questão.

Para a caracterização da diversidade genética de FIV em Portugal e nas Ilhas, seria útil um estudo suportado por um número de isolados mais significativo e representativo de cada região, incluindo amostras de outras áreas geográficas, de norte a sul do país, e também considerar o estudo de outras ilhas dos Açores e da Madeira.

Tendo em conta que a análise filogenética não é um método absolutamente preciso (Felsenstein, 1985, p. 13), este estudo deveria ser suportado pela análise de outros genes virais, incluindo, por exemplo, a análise paralela do gene *gag* ou de uma região genómica maior (análise da totalidade do gene *env* ou do genoma viral completo). A classificação das amostras em estudo não é portanto inequívoca, embora os resultados evidenciem a existência de 4 subtipos e a distinção de pelo menos 4 subgrupos no subtipo B, o que reflete um aumento da diversidade genética do vírus no país, sobretudo devido à aparente emergência do subtipo E (6 amostras da UZL) na população felina do concelho de Lisboa.

Apesar da heterogeneidade genética verificada e das diferentes localizações geográficas incluídas no estudo, a grande maioria das novas sequências portuguesas pertence ao subtipo A

ou B, embora o primeiro represente uma percentagem quase 3 vezes inferior à de B. A distribuição encontrada para os subtipos A e B, que incluem 80% das amostras, é similar à que Bachmann (1997) verificou num dos primeiros estudos de diversidade molecular do FIV. A média de distâncias genéticas dentro dos subtipos oscilou entre 0.070 e 0.183 e entre subtipos os valores variaram de 0.174 a 0.271. Embora o valor máximo de diversidade viral observado dentro dos subtipos (0.183) seja superior ao valor mínimo verificado entre subtipos (0.174), em termos percentuais, estes valores são comparáveis com os observados por Sodora e seus colaboradores (1994) (2,5% – 15% dentro dos subtipos e 17,8% – 26,2% entre subtipos). Por outro lado, o valor mais alto da média de distâncias genéticas dentro dos subtipos (18,3%) não ultrapassou o valor de diversidade entre subtipos referido por outros autores (20%) (Kakinuma et al., 1995; Bachmann et al., 1997), o que dá robustez à subtipificação molecular neste estudo realizada.

Os subtipos A e C são os mais distantes entre si, apresentando o valor médio de distâncias genéticas mais alto de todas as combinações de subtipos (0.271). Se considerarmos apenas os subtipos identificados em Portugal, os subtipos mais distantes entre si são os subtipos A e E (0.264), em contraste com os subtipos B e E, que apresentam o valor mais baixo (0,174). Os subtipos B e E são portanto os que apresentam sequências mais semelhantes. Esta evidência poderia justificar a inclusão das amostras E (portuguesas e argentinas) num subgrupo do subtipo B. Contudo, a percentagem média de distâncias genéticas entre os subtipos B e E, sem inclusão das novas sequências portuguesas classificadas como E, é também inferior a 20% (17.2%), tendo as amostras da Argentina sido previamente classificadas como subtipo E.

Dos quatro subtipos identificados no país, o subtipo A é o que apresenta maior valor de *bootstrap* (100%), reunindo exclusivamente amostras do concelho de Lisboa.

Aparentemente, o subtipo B é o mais comum na população portuguesa de felinos infetados por FIV, reunindo neste estudo o maior número de amostras. Além disso, é o subtipo que revela maior heterogeneidade, não só por abranger as três localizações geográficas em estudo (para além de sequências já caracterizadas de 3 continentes) mas também pela distinção de 4 subgrupos, dois deles suportados por valores elevados de *bootstrap*. A divisão do subtipo B em subgrupos já tinha sido referida noutros estudos (Sodora et al., 1994; Bachmann et al., 1997; Steinrigl & Klein, 2003), inclusivamente em Portugal (Duarte & Tavares, 2006). As médias de distâncias genéticas entre subgrupos são superiores às que se observaram dentro do subtipo B, tal como Duarte & Tavares (2006) verificaram num estudo anterior.

As sequências do subtipo A são as que revelam maior semelhança genética entre si, apresentando o valor mais baixo de distâncias genéticas em comparação com os restantes subtipos (0.070).

Embora as sequências do subtipo A sejam menos diversificadas que as do subtipo B (valores médios de divergência genética dentro dos subtipos de 0.070 e 0.106, respetivamente), a presença de pequenos grupos bem suportados (*bootstrap* de 100%) é evidente em ambos os subtipos, à semelhança do que já Bachmann e seus colaboradores (1997) tinham reportado. Os grupos identificados nestes subtipos são compostos por duas a três amostras da mesma localização geográfica e apresentam sequências nucleotídicas praticamente iguais, o que reforça a existência de uma relação entre divergência genética e distância geográfica ou segregação, já antes referida por Bendinelli e seus colaboradores (1995). Além disso, as amostras que compõem estes grupos correspondem a gatos sujeitos a confinamento (UZL) ou a gatos errantes em áreas de pequenas dimensões (ilha de S. Miguel), situações que propiciam a ocorrência de lutas, favorecendo a transmissão do vírus. Esta evidência, aliada à similaridade reconhecida entre estas amostras, sugere a transmissão direta do vírus entre os indivíduos a partir dos quais se obtiveram as referidas amostras.

As amostras dos Açores pertencem todas ao subtipo B, tendo a grande maioria (todas à exceção de duas) agrupado num único subgrupo (B1), o que revela elevada identidade genética entre as sequências açorianas. A evidência de que o subtipo B é o mais comum em Portugal continental sugere que a introdução deste subtipo na ilha de S. Miguel terá resultado do transporte de felinos infetados do continente para lá. O isolamento físico da ilha poderá de alguma forma dificultar a introdução de novos subtipos e perpetuar a baixa diversidade verificada entre estas sequências.

A maioria das amostras de Portugal continental do subtipo B (todas, à exceção da 75UZ) agrupou com duas sequências já caracterizadas identificadas também em Portugal continental. Este agrupamento de amostras (novas sequências e sequências já caracterizadas) é suportado por um valor de *bootstrap* de 96%, pertencendo ao subgrupo B3.

O subgrupo B1 abrange a maioria das amostras dos Açores e o subtipo B3 a maioria das amostras de Portugal continental. Esta distribuição poderá estar relacionada com a localização geográfica das amostras que os compõem, uma vez que as pressões genéticas evolutivas em Portugal continental e nos Açores poderão ser distintas.

À semelhança do que se observou em anteriores análises filogenéticas de isolados portugueses de FIV (Duarte, Marques, Tavares & Fevereiro, 2002; Duarte & Tavares, 2006), neste estudo

não foram identificados os subtipos C e D. No entanto, foi detetada uma amostra do subtipo F, já antes reportado no país (Duarte & Tavares 2006).

O subtipo E foi pela primeira vez identificado em Portugal, em seis amostras da UZL. O agrupamento destas amostras com sequências da Argentina é bastante intrigante tendo em conta a distância geográfica entre elas. O transporte transcontinental de felinos infetados pelo subtipo E, da Argentina para Portugal, poderá justificar a introdução deste subtipo no país. Apesar de agruparem no mesmo subtipo, as amostras portuguesas apresentam maiores semelhanças genéticas entre si (média de percentagens de divergência genética de 9,9%) que com as da Argentina (média de percentagens de divergência genética de 18,3%). As distâncias genéticas entre as sequências nucleotídicas dos dois países poderão ser devidas a diferentes pressões genéticas e evolutivas entre eles. Esta divergência, suportada por valores de *bootstrap* significativos, poderá justificar uma posterior divisão do subtipo E em subgrupos, à semelhança do que foi feito com o subtipo B. Aceitando a hipótese de que o subtipo E terá sido introduzido em Portugal a partir de gatos infetados provenientes da Argentina, uma divisão do subtipo E em subgrupos seria compatível com o pressuposto de que isolados de diferentes subgrupos terão divergido de um ancestral comum e posteriormente sofrido pressões genéticas e evolutivas diferentes (Pistello et al., 1997). Apesar da notável diversidade genética dentro do subtipo B, as sequências E são as menos semelhantes entre si, apresentando o valor mais alto de média de distâncias genéticas (0,183). Embora em termos percentuais (18,3%) seja um valor superior à máxima de distâncias dentro de subtipos referida por Sodora e seus colaboradores (1994) (15%), não ultrapassa os 20%, como já referido, o que de alguma forma certifica a inclusão das 6 amostras da UZL no subtipo E.

O método filogenético utilizado não considera o perfil evolutivo das sequências analisadas, originando uma árvore sem raiz, e impede a deteção de um ancestral comum. Embora a filogenia inferida a partir do alinhamento realizado neste estudo seja predominantemente descritiva, não inferindo sobre a pressão evolutiva dos vários subtipos, permitiu a identificação de 4 subtipos de FIV em circulação no concelho de Lisboa (A, B, E e F), que inclui as amostras da UZL e Monsanto, em contraste com as amostras da Moita e dos Açores, nas quais apenas foi detetado o subtipo B. Desta forma, atingiram-se os objetivos propostos, através da determinação da diversidade genética de amostras das três áreas geográficas em estudo. Para além dos três subtipos já anteriormente reportados em Portugal (A, B e F) (Duarte et al., 2002; Duarte & Tavares, 2006), foi identificado o subtipo E, o que comprova que a diversidade genética em Portugal não é estática.

V. CONCLUSÃO

Como apenas foram analisadas amostras de três zonas do país (Lisboa, Moita e Açores), o presente estudo não expressa as características epidemiológicas da população felina infetada por FIV em Portugal. No entanto, permitiu demonstrar a crescente diversidade genética do vírus no país, pela aparente emergência do subtipo E no concelho de Lisboa e pela identificação de diferentes subgrupos dentro do subtipo B.

A população felina de Portugal apresenta em circulação 4 subtipos de FIV: A, B, E e F. O subtipo B foi o que maior número de sequências reuniu, abrangendo amostras dos 3 grupos geográficos analisados (concelho de Lisboa – UZL e Monsanto –, Moita e Açores), sendo aparentemente o mais comum em Portugal Continental e o único detetado nos Açores. Apesar do isolamento físico do arquipélago, o transporte de animais é cada vez mais comum, aumentando o risco da introdução de novos subtipos virais na população felina da ilha de S. Miguel.

A crescente heterogeneidade genética dentro do subtipo B, já referida por diversos autores (Sodora et al., 1994; Bachmann et al., 1997; Steinrigl & Klein, 2003; Weaver et al., 2004; Duarte & Tavares, 2006; Lara, Taniwaki & Jr, 2007), destaca a necessidade de divisão do mesmo em subgrupos ou até mesmo em subtipos, de acordo com a divergência genética e a consistência de agrupamento filogenético.

O subtipo A, ausente na amostra populacional da Moita e dos Açores, ocorre com menos frequência que o subtipo B, embora inclua um número considerável de amostras de felinos do concelho de Lisboa (UZL e Monsanto).

Aparentemente, Portugal Continental e os Açores continuam livres dos subtipos C e D, mas o subtipo F, já anteriormente descrito no país (Duarte & Tavares, 2006), foi mais uma vez identificado, embora numa única amostra.

Este foi o primeiro estudo filogenético de caracterização molecular do FIV fora do concelho de Lisboa, incluindo isolados da Moita e dos Açores.

Seria interessante dar continuidade a este estudo e incluir uma amostra populacional mais significativa, com um maior número de isolados, representativos de diferentes áreas geográficas, de norte a sul do país, incluindo todas as ilhas. Estes estudos seriam relevantes para a avaliação da introdução de uma vacina eficaz contra os subtipos identificados.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, J. R., Pu, R., Coleman, J. K., & Yamamoto, J. K. (2012). Utilization of feline ELISPOT for mapping vaccine epitopes [abstract]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 792, 47–63. Acedido em Mar 13, 2015, disponível em: http://doi.org/10.1007/978-1-61779-325-7_4.
- Ackley, C. D., Yamamoto, J. K., Levy, N., Pedersen, N. C., & Cooper, M. D. (1990). Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 64(11), 5652–5655. Acedido em Out 16, 2014, disponível em: <http://jvi.asm.org/content/64/11/5652.short>.
- Agnew, W. & Korman, R. (2014). Pharmacological appetite stimulation: rational choices in the inappetent cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16, 749-756.
- Akhtardanesh, B., Ziaali, N., Sharifi, H., & Rezaei, S. (2010). Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 306–310. Acedido em Nov 11, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.015>.
- Alves, F., Mazur, C., de Souza Rajão, D., Del Puerto, H. L., Braz, G. F., de Oliveira Vieira, F., Leite, R. C., de Sousa Martins, A. & dos Reis, J. K. P. (2013). Indirect Western blot in the diagnosis of feline immunodeficiency virus. *Revista Da FZVA*, 19(1). Acedido em Mas 16, 2015, disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewArticle/9606>.
- Bach, J. M., Hurtrel, M., Chakrabarti, L., Ganiere, J. P., Montagnier, L., & Hurtrel, B. (1994). Early stages of feline immunodeficiency virus infection in lymph nodes and spleen. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10(12), 1731–1738.
- 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(6), 4241–4253.
- Bande, F., Arshad, S. S., Hassan, L., Zakaria, Z., Sopian, N. A., Rahman, N. A., & Alazawy, A. (2012). Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 33.
- Baneth, G., Kass, P. H., Steinfeld, D., & Besser, M. (1999). A Seroepidemiological Study of Feline Coronavirus, Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Among Cats in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 54, 39–43.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Del Mauro, D., Cammarota, G., Maggi, F., Leonildi, A., Giannechini, S., Bergamini, C. & Matteucci, D. (2001). During Readaptation In Vivo, a Tissue Culture-Adapted Strain of Feline Immunodeficiency Virus Reverts to Broad Neutralization Resistance at Different Times in Individual Hosts but through Changes at the Same Position of the Surface Glycoprotein. *Journal of Virology*, 75(10), 4584–4593. Acedido em Nov 16, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4584-4593.2001>.

- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Malvaldi, G. & Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 87–112.
- Bienzle, D., Reggeti, F., Wen, X., Little, S., Hobson, J., & Kruth, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(9), 753.
- Botelho, S. M. A. (2014). *Estudo epidemiológico do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos errantes e assilvestrados da ilha de São Miguel, Açores*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Acedido em Jun 2, 2015, disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6751>.
- Brennan, G., Podell, M. D., Wack, R., Kraft, S., Troyer, J. L., Bielefeldt-Ohmann, H., & VandeWoude, S. (2006). Neurologic Disease in Captive Lions (*Panthera leo*) with Low-Titer Lion Lentivirus Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4345–4352. Acedido em Nov 24, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JCM.00577-06>.
- Burkhard, M. J., & Dean, G. A. (2003). Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Current HIV Research*, 1(1), 15–29.
- Caddy, S. (2014). Efficacy of veterinary antivirals in small animals. *Veterinary Times*, (19). Acedido em Set 14, 2015, disponível em: <http://www.vetonline.com/publications/veterinary-times/archives/n-44-19/efficacy-of-veterinary-antivirals-in-small-animals.html>.
- Caldas, A. P. F., de Souza Leal, É., Silva, E. F. A., & Ravazzolo, A. P. (2000). Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos em gatos domésticos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. *Pesq. Vet. Bras*, 20(1), 20–25.
- Caney, S. (2005). Antiviral therapy in cats: current rationale and recommendations. *In Practice*, 27(9), 454–457. Acedido em Mar 23, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1136/inpract.27.9.454>.
- Carpenter, M. A., Brown, E. W., MacDonald, D. W., & O'Brien, S. J. (1998). Phylogeographic Patterns of Feline Immunodeficiency Virus Genetic Diversity in the Domestic Cat. *Virology*, 251(2), 234–243. Acedido em Ago 18, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9402>.
- Carpenter, M. A., & O'Brien, S. J. (1995). Coadaptation and immunodeficiency virus: lessons from the felidae. *Current Opinion in Genetics & Development* 5:739-745.
- Chhetri, B. K., Berke, O., Pearl, D. L., & Bienzle, D. (2013). Comparison of the geographical distribution of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in the United States of America (2000–2011). *BMC Veterinary Research*, 9(1), 2.
- Collado, V. M., Gómez-Lucía, E., Tejerizo, G., Miró, G., Escolar, E., Martín, S., & Doménech, A. (2007). Effect of type I interferons on the expression of feline leukaemia virus. *Veterinary Microbiology*, 123(1), 180–186.

- Courchamp, F., & Pontier, D. (1994). Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences de La Vie*, 317(12), 1123–1134.
- Courchamp, F., Yoccoz, N. G., Artois, M., & Pontier, D. (1998). 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*, 121(01), 227–236.
- Cravo, J. (2011). *Efeito do tratamento por interferão ómega de origem felina (rFeIFN- ω) na evolução clínica de gatos naturalmente infectados com os vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia felinas (FELV) e na excreção de vírus respiratórios concomitantes*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Acedido em Jun 2, 2015, disponível em: <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/3793>.
- Crawford, P. C., & Levy, J. K. (2007). New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 37(2), 335–350, vii. Acedido em Nov 19, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.11.011>.
- Dandekar, S., Beebe, A. M., Barlough, J., Phillips, T., Elder, J., Torten, M., & Pedersen, N. (1992). Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *Journal of Virology*, 66(7), 4040–4049.
- Danner, R. M., Goltz, D. M., Hess, S. C., & Banko, P. C. (2007). Evidence of feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, and *Toxoplasma gondii* in feral cats on Mauna Kea, Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(2), 315–318. Acedido em Nov 5, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.7589/0090-3558-43.2.315>.
- Dean, G. A., Reubel, G. H., Moore, P. F., & Pedersen, N. C. (1996). Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus in lymphocyte subsets of blood and lymph node. *Journal of Virology*, 70(8), 5165–5169.
- de Mari, K., Maynard, L., Sanquer, A., Lebreux, B., & Eun, H.-M. (2004). Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon-co on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(4), 477–482.
- de Rozieres, S., Mathiason, C. K., Rolston, M. R., Chatterji, U., Hoover, E. A., & Elder, J. H. (2004). Characterization of a Highly Pathogenic Molecular Clone of Feline Immunodeficiency Virus Clade C. *Journal of Virology*, 78(17), 8971–8982. Acedido em Nov 14, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.17.8971-8982.2004>.
- Doménech, A., Miró, G., Collado, V. M., Ballesteros, N., Sanjosé, L., Escolar, E., Martin, S., & Gomez-Lucia, E. (2011). Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: From theory to practice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 301–306. Acedido em Ago 23, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.06.008>.
- Domingo, E., Biebricher, C. K., Eigen, M., & Holland, J. J. (2001). Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. *Eurekah.com*.

- Dow, S. W., Dreitz, M. J., & Hoover, E. A. (1992). Feline immunodeficiency virus neurotropism: evidence that astrocytes and microglia are the primary target cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35(1–2), 23–35. Acedido em Nov 11, 2014, disponível em: [http://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90118-A](http://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90118-A).
- Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I. M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J., Fazendeiro, M., Tavares, L. & Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(6), 441–446. Acedido em Nov 5, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.11.003>.
- Duarte, A., Gil, S., Leal, R., & Tavares, L. (2012). Vírus da imunodeficiência felina: da etiologia às novas abordagens terapêuticas. *Medicina Veterinária*.
- Duarte, A., Marques, M. I., Tavares, L., & Fevereiro, M. (2002). Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. *Archives of Virology*, 147(5), 1061–1070. Acedido em Out 14, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00705-002-0785-7>.
- Duarte, A., & Tavares, L. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency Virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*, 114(1-2), 25–33. Acedido em Out q4, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.056>.
- Dunham, S., & Oswald, J. (2006). FIV as a Model for AIDS Vaccine Studies. In *In vivo models of HIV disease and control*. New York: Springer. Acedido em Nov 14, 2014, disponível em: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=301828>.
- Dunham, S. P. (2006). Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(1-2), 67–77. Acedido em Out 7, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.013>.
- Dunham, S. P., & Graham, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 879–901. Acedido em Out 7, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.005>.
- Elder, J. H., Lin, Y.-C., Fink, E., & Grant, C. K. (2010). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) as A Model for Study of Lentivirus Infections: Parallels with HIV. *Current HIV Research*, 8(1), 73–80.
- English, R. V., Johnson, C. M., Gebhard, D. H., & Tompkins, M. B. (1993). In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 67(9), 5175–5186.
- European Advisory Board on Cat Diseases. (2012). Guidelines: Feline Immunodeficiency. Acedido em Nov 12, 2014, disponível em: http://www.abcd-vets.org/Guidelines/Pages/en-1201-Feline_Immunodeficiency.aspx.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The University of Chicago Press*, 125(1), 1–15.
- Gallo, D., Diggs, J. L., Shell, G. R., Dailey, P. J., Hoffman, M. N., & Riggs, J. L. (1986). Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome

virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence, and Western blot methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(6), 1049–1051.

- Gemeniano, M. C., Sawai, E. T., Leutenegger, C. M., & Sparger, E. E. (2003). Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Is Required for Virus Particle Formation and Virus Infectivity. *Journal of Virology*, 77(16), 8819–8830. Acedido em Jan 7, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8819-8830.2003>.
- Gil, S., Leal, R. O., Duarte, A., McGahie, D., Sepúlveda, N., Siborro, I., Cravo, J., Cartaxeiro, C., Tavares, L. M. (2013). Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 753–763. Acedido em Set 14, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.025>.
- Gil, S., Leal, R. O., McGahie, D., Sepúlveda, N., Duarte, A., Niza, M. M. R. E., & Tavares, L. (2014). Oral Recombinant Feline Interferon-Omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: Clinical and laboratory evaluation. *Research in Veterinary Science*, 96(1), 79–85. Acedido em Nov 10, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.007>.
- Grace, S. F. (2011). Feline immunodeficiency virus infection. In *The Feline Patient* (4th ed, pp. 179–180). John Wiley & Sons.
- Greene, W. K., Meers, J., Chadwick, B., Carnegie, P. R., & Robinson, W. F. (1993). Nucleotide sequences of Australian isolates of the feline immunodeficiency virus: comparison with other feline lentiviruses. *Archives of Virology*, 132(3-4), 369–379.
- Hartmann, K. (2012). Antiviral and Immunomodulatory Chemotherapy. In *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 10–24). St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders. Acedido em Mar 23, 2015, disponível em: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Documentos/EnfermedadesInfecciosas/2013/Libros/Greene%20-%20Infectious%20diseases%20ot%20the%20Dog%20and%20Cat%203rd%20Ed/02%20Antiviral%20and%20Immunomodulatory%20Chemotherapy.pdf>.
- Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C., Vidyashankar, A., Jarrett, O., & Egberink, H. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 9(6), 439–445. Acedido em Mar 18, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.04.003>.
- Hartmann, K., Werner, R. M., Egberink, H., & Jarret, O. (2001). Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Journal of the British Veterinary Association*, pp. 317–320.
- Hayward, J. J., & Rodrigo, A. G. (2008). Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. *Virology Journal*, 5(1), 76. Acedido em Out 17, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1186/1743-422X-5-76>.
- Hayward, J. J., & Rodrigo, A. G. (2010). Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(1-2), 68–74. Acedido em Out 27, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.011>.

- Hayward, J. J., Taylor, J., & Rodrigo, A. G. (2007). Phylogenetic Analysis of Feline Immunodeficiency Virus in Feral and Companion Domestic Cats of New Zealand. *Journal of Virology*, *81*(6), 2999–3004. Acedido em Out 27, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.02090-06>.
- Hohdatsu, T., Motokawa, K., Usami, M., Amioka, M., Okada, S., & Koyama, H. (1998). Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. *Journal of Virological Methods*, *70*(1), 107–111. Acedido em Out 31, 2014, disponível em: [http://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00167-5](http://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00167-5).
- Hosie, M. J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsílio, F., Pennisi, Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M. C. (2009). Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *11*(7), 575–584. Acedido em Nov 13, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.006>.
- Hosie, M. J., Osborne, R., Yamamoto, J. K., Neil, J. C., & Jarrett, O. (1995). Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccines. *Journal of Virology*, *69*(2), 1253–1255.
- Hosie, M. J., Pajek, D., Samman, A., & Willett, B. J. (2011). Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Neutralization: A Review. *Viruses*, *3*(12), 1870–1890. Acedido em Out, 25, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.3390/v3101870>.
- Hosie, M. J., Robertson, C., & Jarrett, O. (1989). Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, *125*(11), 293–297. Acedido em Nov 11, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1136/vr.125.11.293>.
- Inada, G., Miyazawa, T., Inoshima, Y., Kohmoto, M., Ikeda, Y., Liu, C. H., Lin, J. A., Kuo, T. F. & Mikami, T. (1997). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus isolated from cats in Taiwan. *Archives of Virology*, *142*(7), 1459–1467.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2013). Acedido em Out 17, 2014, disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Iwata, D., & Holloway, S. (2008). Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from cats in Melbourne. *Australian Veterinary Journal*, *86*(10), 385–389. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2008.00336.x>.
- 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*(6), 3639–3646.
- Kann, R. K. C., Seddon, J. M., Kyaw-Tanner, M. T., Henning, J., & Meers, J. (2014). Association between feline immunodeficiency virus (FIV) plasma viral RNA load, concentration of acute phase proteins and disease severity. *The Veterinary Journal*, *201*(2), 181–183. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.01.023>.

- Kann, R., Seddon, J., Kyaw-Tanner, M., & Meers, J. (2007). Co-infection with different subtypes of feline immunodeficiency virus can complicate subtype assignment by phylogenetic analysis. *Archives of Virology*, *152*(6), 1187–1193. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00705-007-0940-2>.
- Kann, R., Seddon, J., Kyaw-Tanner, M., Schoeman, J. P., Schoeman, T., & Meers, J. (2006). Phylogenetic analysis to define feline immunodeficiency virus subtypes in 31 domestic cats in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, *77*(3), p–108.
- Kelly, P. J., Stocking, R., Gao, D., Phillips, N., Xu, C., Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2011). Identification of feline immunodeficiency virus subtype-B on St. Kitts, West Indies by quantitative PCR. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *5*(06), 480–483.
- Kenyon, J. C., & Lever, A. M. L. (2011). The Molecular Biology of Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Viruses*, *3*(11), 2192–2213. Acedido em Out 21, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.3390/v3112192>.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120.
- Kurosawa, K., Ikeda, Y., Miyazawa, T., Izumiya, Y., Nishimura, Y., Nakamura, K., ... Takahashi, E. (1999). Development of Restriction Fragment-Length Polymorphism Method to Differentiate Five Subtypes of Feline Immunodeficiency Virus. *Microbiology and Immunology*, *43*(8), 817–820.
- Kusuhara, H., Hohdatsu, T., Seta, T., Nemoto, K., Motokawa, K., Gemma, T., ... Koyama, H. (2007). Serological differentiation of FIV-infected cats from dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine (Fel-O-Vax FIV) inoculated cats. *Veterinary Microbiology*, *120*(3–4), 217–225. Acedido em Mar 11, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.038>.
- Lara, V. M., Taniwaki, S. A., & Jr, J. P. A. (2007). Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras*, *27*(11), 467–470.
- Lenette, E. T., Karpatkin, S., & Levy, J. A. (1987). Indirect immunofluorescence assay for antibodies to human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology*, *25*(2), 199–202.
- Levy, J. K. & Crawford, P. C. (2010). Feline Immunodeficiency virus. In Ettinger, S.J. (Ed), *Textbook of veterinary internal medicine*. (7th ed.). (p931, 934). St Louis: Elsevier.
- Levy, J. K., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmannlehmann, R., Little, S., Sundahl, E., & Thayer, V. (2008a). 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, *10*(3), 300–316. Acedido em Mar 9, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.03.002>.
- Levy, J. K., Crawford, P. C., Kusuhara, H., Motokawa, K., Gemma, T., Watanabe, R., ... Hohdatsu, T. (2008b). Differentiation of Feline Immunodeficiency Virus Vaccination, Infection, or Vaccination and Infection in Cats. *Journal of Veterinary Internal*

Medicine, 22(2), 330–334. Acedido em Mar 10, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0078.x>.

- Levy, J. K., Crawford, P. C., & Slater, M. R. (2004). Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(10), 1558–1561.
- Lockridge, K. M., Chien, M., Dean, G. A., Stefano Cole, K., Montelaro, R. C., Luciw, P. A., & Sparger, E. E. (2000). Protective Immunity against Feline Immunodeficiency Virus Induced by Inoculation with vif-Deleted Proviral DNA. *Virology*, 273(1), 67–79. Acedido em Mar 13, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0395>.
- Maclachlan, N. J., Dubovi, E. J., & Fenner, F. (2011). *Fenner's veterinary virology*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. Acedido em Out 22, 2014, disponível em: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=662114>.
- Mahony, J., Rosenthal, K., Chernesky, M., Castriciano, S., Scheid, E., Blajchman, M., & Harnish, D. (1989). Agreement study between two laboratories of immunofluorescence as a confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 antibody screening. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(6), 1234–1237.
- Marçola, T. G., Gomes, C. P. C., Silva, P. A., Fernandes, G. R., Paludo, G. R., & Pereira, R. W. (2013). Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. *Virus Genes*, 46(3), 546–550. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1007/s11262-013-0877-3>.
- 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-Naive Cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology*, 82(16), 7863–7874. Acedido em Out 25, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.00310-08>.
- Matteucci, D., Baldinotti, F., Mazzetti, P., Pistello, M., Bandecchi, P., Ghilarducci, R., Poli, A., Tozzini, F. & Bendinelli, M. (1993). Detection of feline immunodeficiency virus in saliva and plasma by cultivation and polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), 494–501.
- Moench, T. R., Whaley, K. J., Mandrell, T. D., Bishop, B. D., Witt, C. J., & Cone, R. A. (1993). The cat/feline immunodeficiency virus model for transmucosal transmission of AIDS: nonoxynol-9 contraceptive jelly blocks transmission by an infected cell inoculum. *AIDS (London, England)*, 7(6), 797–802.
- Mortola, E., Oliva, G., Risso, M., Pecoraro, M., & Venturini, M. C. (2004). Feline immunodeficiency virusinfection: a comparative study of different diagnostic techniques. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 56(1), 13–18.
- Nakamura, K., Suzuki, Y., Ikeo, K., Ikeda, Y., Sato, E., Nguyen, N. T. P., Gojobori, T., Mikami, T. & Miyazawa, T. (2003). Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Archives of Virology*, 148(4), 783–791. Acedido em Ago 17, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00705-002-0954-8>.

- Nakamura, Y., Ura, A., Hirata, M., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., ... Endo, Y. (2010). An updated nation-wide epidemiological survey of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci*, 72, 1051–1056.
- Nathanson, N., & Mathieson, B. J. (2000). Biological considerations in the development of a human immunodeficiency virus vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 182(2), 579–589.
- Nishimura, Y., Goto, Y., Pang, H., Endo, Y., Mizuno, T., Momoi, Y., Watari, T. Tsujimoto H. & Hasegawa, A. (1998). Genetic heterogeneity of env gene of feline immunodeficiency virus obtained from multiple districts in Japan. *Virus Research*, 57(1), 101–112.
- Norris, J. M., Bell, E. T., Hales, L., Toribio, J.-A. L. M. L., White, J. D., Wigney, D. I., Baral, R. M. & Malik, R. (2007). Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(4), 300–308. Acedido em Nov 5, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.01.007>.
- Novotney, C., English, R. V., Housman, J., Davidson, M. G., Nasisse, M. P., Jeng, C. R., Davis, W. C. & Tompkins, M. B. (1990). Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS (London, England)*, 4(12), 1213–1218.
- O'Connor, T. P., Tanguay, S., Steinman, R., Smith, R., Barr, M. C., Yamamoto, J. K., Pedersen, N. C., Andersen, P. R. & Tonelli, Q. J. (1989). Development and evaluation of immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (feline immunodeficiency virus). *Journal of Clinical Microbiology*, 27(3), 474–479.
- Oğuzoğlu, T. Ç., Timurkan, M. Ö., Muz, D., Kudu, A., Numanbayraktaroğlu, B., Sadak, S., & Burgu, I. (2010). First molecular characterization of feline immunodeficiency virus in Turkey. *Archives of Virology*, 155(11), 1877–1881. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00705-010-0830-x>.
- 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(10), 6008–6018.
- O'Neil, L. L., Burkhard, M. J., Diehl, L. J., & Hoover, E. A. (1995). Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11(1), 171–182.
- O'Neil, L. L., Burkhard, M. J., & Hoover, E. A. (1996). Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. *Journal of Virology*, 70(5), 2894–2901.
- Ostrowski, S., Van Vuuren, M., Lenain, D. M., & Durand, A. (2003). A serologic survey of wild felids from central west Saudi Arabia. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 696–701.

- Paillart, J.-C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., & Mak, J. (2004). Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 461–472. Acedido em Out 23, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrmicro903>.
- Pancino, G., Chappey, C., Saurin, W., & Sonigo, P. (1993). B epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology*, 67(2), 664–672.
- Paul, T. A., Casey, J. W., Avery, R. J., & Sutton, C. A. (2007). Expression of feline immunodeficiency virus Vif is associated with reduced viral mutation rates without restoration of replication of vif mutant viruses. *Virology*, 361(1), 112–122. Acedido em Jan 7, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.005>.
- Payne, S., & Elder, J. (2001). The Role of Retroviral dUTPases in Replication and Virulence. *Current Protein & Peptide Science*, 2(4), 381–388. Acedido em Out 29, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.2174/1389203013381008>.
- Pecon-Slattey, J., Troyer, J. L., Johnson, W. E., & O'Brien, S. J. (2008). Evolution of feline immunodeficiency virus in Felidae: Implications for human health and wildlife ecology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1-2), 32–44. Acedido em Out 24, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.010>.
- 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(9), 2031–2035.
- 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 (New York, N.Y.)*, 235(4790), 790–793.
- Pedersen, N. C., Yamamoto, J. K., Ishida, T., & Hansen, H. (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 21(1), 111–129.
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferon and Related Receptors. In A. Meager (Ed.), *The Interferons* (pp. 113–140). Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Acedido em Set 14, 2014, disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527608206.ch5>.
- Phillips, T. R., Lamont, C., Konings, D. A., Shacklett, B. L., Hamson, C. A., Luciw, P. A., & Elder, J. H. (1992). Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 66(9), 5464–5471.
- Phillips, T. R., Talbott, R. L., Lamont, C., Muir, S., Lovelace, K., & Elder, J. H. (1990). Comparison of two host cell range variants of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, 64(10), 4605–4613.
- 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. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 9), 2247–2257.
- Pistello, M., Moscardini, M., Mazzetti, P., Bonci, F., Zaccaro, L., Isola, P., Freer, G., Specter, S., Matteucci, D. & Bendinelli, M. (2002). Development of Feline Immunodeficiency

- Virus ORF-A (tat) Mutants: In Vitro and in Vivo Characterization. *Virology*, 298(1), 84–95. Acedido em Jan 9, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1006/viro.2002.1442>.
- Pu, R., Coleman, J., Omori, M., Arai, M., Hohdatsu, T., Huang, C., Tanabe, T. & Yamamoto, J. K. (2001). Dual-subtype FIV vaccine protects cats against in vivo swarms of both homologous and heterologous subtype FIV isolates. *Official Journal Of The International AIDS Society*, 15(10), 1225–1237.
- Reggeti, F., & Bienzle, D. (2004). Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *Journal of General Virology*, 85(7), 1843–1852. Acedido em Out 20, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1099/vir.0.19743-0>.
- Richards, J. R. (2005). Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 33(4), 215–217. Acedido em Nov 19, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.08.004>.
- Rimmelzwaan, G. F., Siebelink, K. H., Broos, H., Drost, G. A., Weijer, K., van Herwijnen, R., & Osterhaus, A. D. (1994). gag- and env-specific serum antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Microbiology*, 39(1-2), 153–165.
- Rodrigues, C. V. de B. (2012). *Prevalência de vírus da imunodeficiência felina, vírus da leucemia felina, calicivírus felino, herpesvírus felino tipo 1 e candida spp. em felinos errantes e possível associação a gengivo-estomatite crónica felina e a doença respiratória felina*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Acedido em Fev 6, 2015, disponível em: <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/3791>.
- Rosado, R. C. (2009). Rastreio Viroológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral. Acedido em Out 25, 2014, disponível em: <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/1465>.
- Sand, C., Englert, T., Egberink, H., Lutz, H., & Hartmann, K. (2010). Evaluation of a new in-clinic test system to detect Feline Immunodeficiency Virus(FIV) and Feline Leukemia Virus(FeLV) infection.
- Scherk, M. A., Ford, R. B., Gaskell, R. M., Hartmann, K., Hurley, K. F., Lappin, M. R., Levy, J. K., Little, S. E., Nordone, S. K. & Sparkes, A. H. (2013). 2013 AAFP Feline Vaccination Advisory Panel Report. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(9), 785–808. Acedido em Mar 13, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1177/1098612X13500429>.
- Sellon, R. K., & Hartmann, K. (2012). Feline Immunodeficiency Virus Infection. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Shimojima, M., Miyazawa, T., Ikeda, Y., McMonagle, E. L., Haining, H., Akashi, H., Takeuchi, Y., Hosie, M. J. & Willett, B. J. (2004). Use of CD134 As a Primary Receptor by the Feline Immunodeficiency Virus. *Science*, 303(5661), 1192–1195. Acedido em Nov 13, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1126/science.1092124>.

- Siebelink, K. H., Bosch, M. L., Rimmelzwaan, G. F., Meloen, R. H., & Osterhaus, A. D. (1995). Two different mutations in the envelope protein of feline immunodeficiency virus allow the virus to escape from neutralization by feline serum antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *46*(1-2), 51–59.
- Siebelink, K. H., Chu, I. H., Rimmelzwaan, G. F., Weijer, K., Osterhaus, A. D., & Bosch, M. L. (1992). Isolation and partial characterization of infectious molecular clones of feline immunodeficiency virus obtained directly from bone marrow DNA of a naturally infected cat. *Journal of Virology*, *66*(2), 1091–1097.
- Siebelink, K. H., Huisman, W., Karlas, J. A., Rimmelzwaan, G. F., Bosch, M. L., & Osterhaus, A. D. (1995). Neutralization of feline immunodeficiency virus by polyclonal feline antibody: simultaneous involvement of hypervariable regions 4 and 5 of the surface glycoprotein. *Journal of Virology*, *69*(8), 5124–5127.
- Siebelink, K. H., Rimmelzwaan, G. F., Bosch, M. L., Meloen, R. H., & Osterhaus, A. D. (1993). A single amino acid substitution in hypervariable region 5 of the envelope protein of feline immunodeficiency virus allows escape from virus neutralization. *Journal of Virology*, *67*(4), 2202–2208.
- 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*(4), 2230–2238.
- Sparger, E. (2006). FIV as a Model for HIV: An Overview. In *In vivo models of HIV disease and control* (pp. 149–237). New York: Springer. Acedido em Nov 14, 2014, disponível em: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=301828>.
- 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*(1-2), 82–89. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.013>.
- Steinrigl, A., & Klein, D. (2003). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *The Journal of General Virology*, *84*(Pt 5), 1301–1307.
- Su, B.-L., Chang, H.-W., Lin, C.-N., Pang, V. F., Chueh, L.-L., & Jeng, C.-R. (2009). An Update on Aspects of Feline Immunodeficiency Virus in Taiwan. *Taiwan Vet. J.*, *35*(3), 167–173.
- Sykes, J. E. (2013). *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Health Sciences.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(12), 2725–2729. Acedido em Jul 7, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Teixeira, B. M., Logan, N., Samman, A., Miyashiro, S. I., Brandão, P. E., Willett, B. J., Hosie M. J. & Hagiwara, M. K. (2011). Isolation and partial characterization of Brazilian

samples of feline immunodeficiency virus. *Virus Research*, 160(1-2), 59–65. Acedido em Out 8, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.007>.

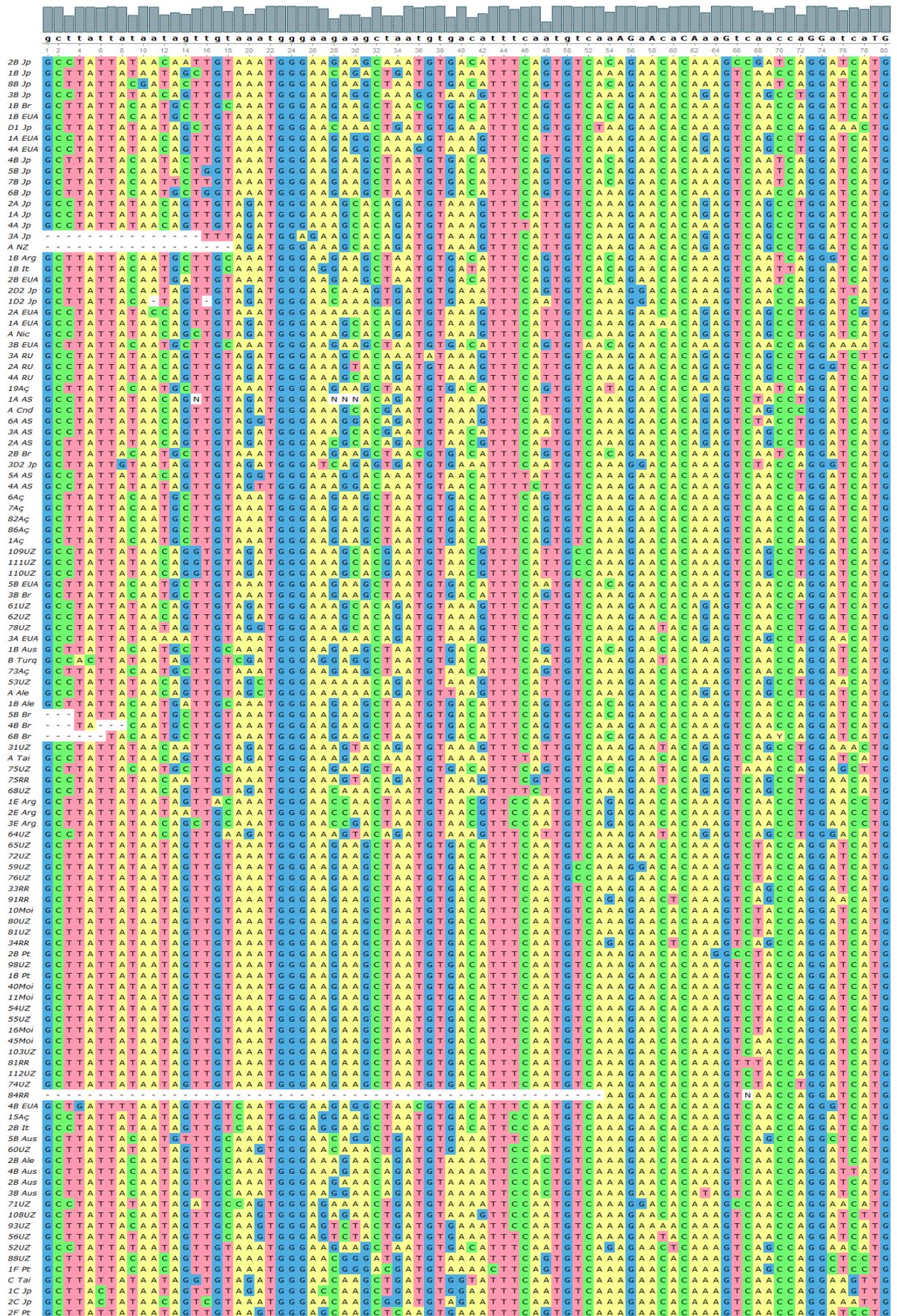
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tijhaar, E. J., Siebelink, K. H., Karlas, J. A., Burger, M. C., Mooi, F. R., & Osterhaus, A. D. (1997). Induction of feline immunodeficiency virus specific antibodies in cats with an attenuated Salmonella strain expressing the Gag protein. *Vaccine*, 15(6-7), 587–596.
- Tomonaga, K., & Mikami, T. (1996). Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. *Journal of General Virology*, 77(8), 1611–1621.
- Tomonaga, K., Norimine, J., Shin, Y.-S., Fukasawa, M., Miyazawa, T., Adachi, A., Toyosaki, T., Kawaguchi, Y., Kai, C. & Mikami, T. (1992). Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *Journal of Virology*, 66(10), 6181–6185.
- Troyer, J. L., Pecon-Slattey, 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. & O'Brien, S. J. (2005). Seroprevalence and Genomic Divergence of Circulating Strains of Feline Immunodeficiency Virus among Felidae and Hyaenidae Species. *Journal of Virology*, 79(13), 8282–8294. Acedido em Out 24, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8282-8294.2005>.
- Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., & White, M. R. H. (2000). Bacteriophages and eukaryotic viruses: RNA viruses. In *Instant notes: molecular biology* (2nd ed., pp. pp.296–299). School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, UK: BIOS Scientific Publishers.
- Uema, M., Ikeda, Y., Miyazawa, T., Lin, A. J., Chen, M.-C., Tkuo, Z.-F., Kai, C., Mikami, T. & Takahashi, E. (1999). Feline immunodeficiency virus subtype C is prevalent in northern part of Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(2), 197–199.
- Uhl, E. W., Heaton-Jones, T. G., Pu, R., & Yamamoto, J. K. (2002). FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review: FIV vaccine 2002 update and review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(3–4), 113–132. Acedido em Mar 13, 2015, disponível em: [http://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00227-1](http://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00227-1).
- Vahlenkamp, T. W., De Ronde, A., Schuurman, N. N., van Vliet, A. L., van Drunen, J., Horzinek, M. C., & Egberink, H. F. (1999). Envelope gene sequences encoding variable regions 3 and 4 are involved in macrophage tropism of feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*, 80(10), 2639–2646.
- VandeWoude, S., & Apetrei, C. (2006). Going Wild: Lessons from Naturally Occurring T-Lymphotropic Lentiviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4), 728–762. Acedido em Out 27, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00009-06>.

- Verschoor, E. J., Hulskotte, E. G., Ederveen, J., Koolen, M. J., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1993). Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology*, *193*(1), 433–438.
- Waters, A. K., de Parseval, A. P., Lerner, D. L., Neil, J. C., Thompson, F. J., & Elder, J. H. (1996). Influence of ORF2 on Host Cell Tropism of Feline Immunodeficiency Virus. *Virology*, *215*(1), 10–16. Acedido em Mar 13, 2015, disponível em: <http://doi.org/10.1006/viro.1996.0002>.
- Weaver, E. A. (2010). A Detailed Phylogenetic Analysis of FIV in the United States. *PLoS ONE*, *5*(8), e12004. Acedido em Out 16, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012004>.
- 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*(4), 2158–2163. Acedido em Out 30, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.4.2158-2163.2004>.
- Willett, B. J., McMonagle, E. L., Logan, N., Spiller, O. B., Schneider, P., & Hosie, M. J. (2007). Probing the Interaction between Feline Immunodeficiency Virus and CD134 by Using the Novel Monoclonal Antibody 7D6 and the CD134 (Ox40) Ligand. *Journal of Virology*, *81*(18), 9665–9679. Acedido em Nov 13, 2014, disponível em: <http://doi.org/10.1128/JVI.01020-07>.
- Winkler, I. G., Löchelt, M., & Flower, R. L. P. (1999). Epidemiology of feline foamy virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic and feral cats: a seroepidemiological study. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(9), 2848–2851.
- Yamada, H., Miyazawa, T., Tomonaga, K., Kawaguchi, Y., Maeda, K., Castellano, M. C., Kai, C., Tohya, Y. & Mikami, T. (1995). Phylogenetic analysis of the long terminal repeat of feline immunodeficiency viruses from Japan, Argentina and Australia. *Archives of Virology*, *140*(1), 41–52.
- Yamamoto, J. K., Hansen, H., Ho, E. W., Morishita, T. Y., Okuda, T., Sawa, T. R., Nakamura, R. M. & Pedersen, N. C. (1989). Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *194*(2), 213–220.
- Yamamoto, J. K., Sparger, E., Ho, E. W., Andersen, P. R., O’connor, T. P., Mandell, C. P., Lowenstine, L., Munn, R. & Pedersen, N. C. (1988). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, *49*(8), 1246–1258.

ANEXO 1 – Quantificação do DNA genómico das amostras em estudo.

Identificação da amostra	Concentração em ácidos nucleicos (ng/μl)	Identificação da amostra	Concentração em ácidos nucleicos (ng/μl)	Identificação da amostra	Concentração em ácidos nucleicos (ng/μl)
1Aç	15,5	39Moi	23,3	78UZ	402,2
6Aç	12,2	40Moi	17,3	80UZ	16,4
7Aç	20	45Moi	19,1	81UZ	24,1
15Aç	29,3	13UZ	6,7	82UZ	14,7
16Aç	8,4	22UZ	7,5	83UZ	19,2
19Aç	12,8	31UZ	6,6	85UZ	25,8
20Aç	94	50UZ	8,8	86UZ	28
73Aç	21,3	52UZ	17,2	87UZ	78,3
77Aç	17,9	53UZ	109,4	88UZ	129,8
79Aç	12,9	54UZ	15,6	89UZ	115,8
82Aç	37,5	55UZ	12,9	90UZ	9,2
86Aç	39,2	56UZ	55,5	91UZ	32,7
33RR	40,3	59UZ	24,8	92UZ	13,1
34RR	101,6	60UZ	27,2	93UZ	26,4
51RR	143,5	61UZ	110,3	94UZ	97,9
53RR	31,2	62UZ	81,2	95UZ	25,9
75RR	49	63UZ	65,2	96UZ	6,2
81RR	79,1	64UZ	17,8	97UZ	22,8
84RR	53,5	65UZ	78,1	98UZ	19,1
91RR	46,5	66UZ	28,3	103UZ	22,2
1Moi	23,5	68UZ	29,9	107UZ	2,8
8Moi	37,1	69UZ	72,5	108UZ	7,1
9Moi	35,7	71UZ	63,4	109UZ	198,7
10Moi	32,9	72UZ	92	110UZ	86,2
11Moi	70,4	73UZ	11,5	111UZ	104,1
12Moi	31,6	74UZ	90,3	112UZ	30,6
16Moi	19,1	75UZ	182,4		
38Moi	12	76UZ	86,6		

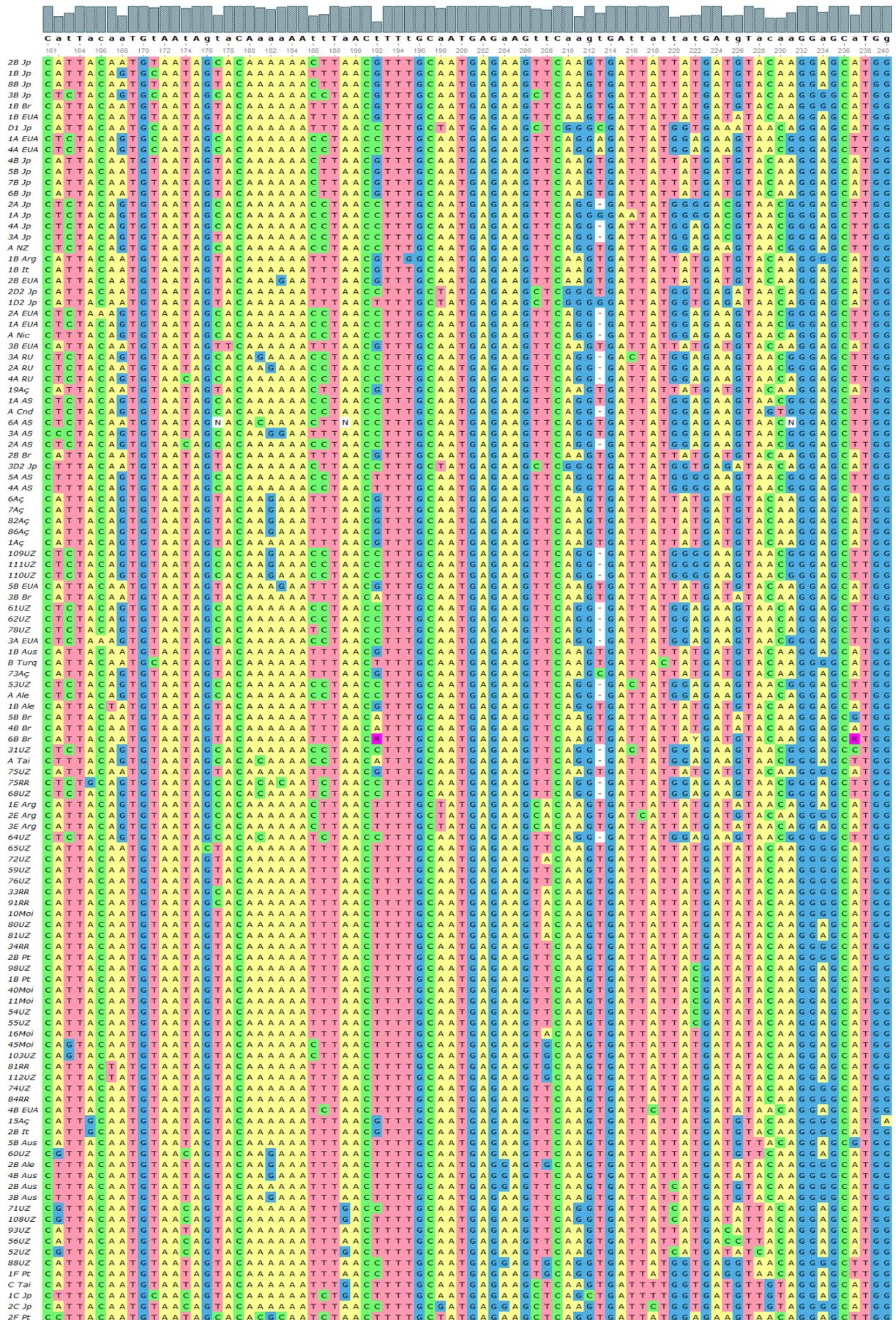
ANEXO 2 – Alinhamento.



ANEXO 2 – Alinhamento (continuação)

The table displays a multiple sequence alignment of DNA sequences. The top row shows the reference sequence: **G a t t a G g a c a a t t c c t c c t c a t G g a a a c a a a g g a A t A g a t G g g a a t G g a g g c c a G a c t t t g A a a g t g A g a a g T a a a a T a t**. The positions are numbered from 81 to 160. The species names are listed on the left, including 2B Jp, 1B Jp, 8B Jp, 3B Jp, 1B Br, 1B EUA, D1 Jp, 1A EUA, 4A EUA, 4B Jp, 5B Jp, 7B Jp, 6B Jp, 2A Jp, 1A Jp, 4A Jp, 3A Jp, A NZ, 1B Arg, 1B It, 2B EUA, 2D2 Jp, 1D2 Jp, 2A EUA, 1A EUA, A Nic, 3B EUA, 3A RU, 2A RU, 4A RU, 19Aç, 1A AS, A Cnd, 6A AS, 3A AS, 2A AS, 2B Br, 3D2 Jp, 5A AS, 4A AS, 6Aç, 7Aç, 82Aç, 86Aç, 1Aç, 109UZ, 111UZ, 110UZ, 5B EUA, 3B Br, 61UZ, 62UZ, 78UZ, 3A EUA, 1B Aus, B Turq, 73Aç, 53UZ, A Ale, 1B Ale, 5B Br, 4B Br, 6B Br, 31UZ, A Tai, 75UZ, 75RR, 68UZ, 1E Arg, 2E Arg, 3E Arg, 64UZ, 65UZ, 72UZ, 59UZ, 76UZ, 33RR, 91RR, 10Moi, 80UZ, 81UZ, 34R, 2B Pt, 98UZ, 1B Pt, 40Moi, 11Moi, 54UZ, 55UZ, 16Moi, 45Moi, 103UZ, 81RR, 112UZ, 74UZ, 94RR, 4B EUA, 15Aç, 2B It, 5B Aus, 60UZ, 2B Ale, 4B Aus, 2B Aus, 3B Aus, 71UZ, 108UZ, 93UZ, 56UZ, 52UZ, 88UZ, 1F Pt, C Tai, 1C Jp, 2C Jp, 2F Pt.

ANEXO 2 – Alinhamento (continuação)



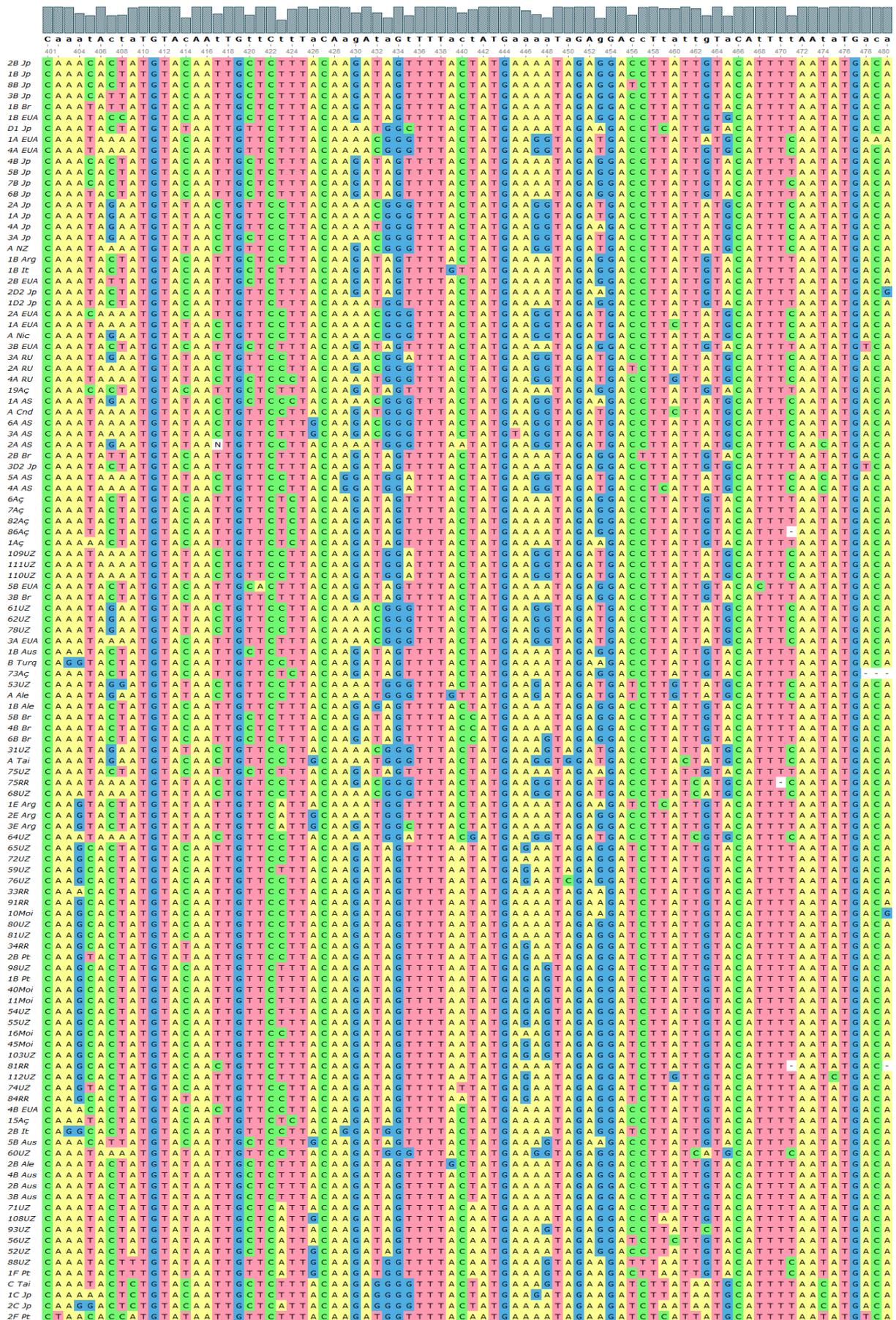
ANEXO 2 – Alinhamento (continuação)

aaataAatctcCactcaattGAtACATGTGGGgacaaactccaaatgtTtacaggagccCaAcCctGTAGAttGtaCtAtGaaag

321 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400

2B Jp
1B Jp
8B Jp
3B Jp
1B Br
1B EUA
D1 Jp
1A EUA
4A EUA
4B Jp
5B Jp
7B Jp
6B Jp
2A Jp
1A Jp
4A Jp
3A Jp
A NZ
1B Arg
1B It
2B EUA
2D2 Jp
1D2 Jp
2A EUA
1A EUA
A Nic
3B EUA
3A RU
2A RU
4A RU
19Ac
1A AS
A Cnd
6A AS
3A AS
2A AS
2B Br
3D2 Jp
5A AS
4A AS
6Ac
7Ac
82Ac
86Ac
1Ac
109UZ
111UZ
110UZ
5B EUA
3B Br
61UZ
62UZ
78UZ
3A EUA
1B Aus
B Turq
73Ac
53UZ
A Ale
1A Ale
5B Br
4B Br
6B Br
31UZ
A Tai
75UZ
75RR
68UZ
1E Arg
2E Arg
3E Arg
64UZ
65UZ
72UZ
59UZ
76UZ
33RR
91RR
10Moi
80UZ
81UZ
34RR
2B Pt
98UZ
1B Pt
40Moi
11Moi
54UZ
55UZ
16Moi
45Moi
103UZ
81RR
112UZ
74UZ
84RR
4B EUA
15Ac
2B It
5B Aus
60UZ
2B Ale
4B Aus
2B Aus
3B Aus
71UZ
108UZ
93UZ
56UZ
52UZ
88UZ
1F Pt
C Tai
1C Jp
2C Jp
2F Pt

ANEXO 2 – Alinhamento (continuação)



ANEXO 3 – Códigos de identificação das sequências já caracterizadas e subtipificadas.

Identificação na árvore filogenética	Subtipo	Localização	Número de Acesso
A 	A	Canadá	GQ422134.1
1A 	A	EUA	M25381*
2A 			U02417.1
3A 			AF542155.1
4A 			GQ420651.1
1B 	B		AY621093.1
2B 			GQ422135.1
3B 			GQ422133.1
4B 			AF542145.1
5B 			AF542160.1
A 	A		Nicarágua
1B 	B	Brasil	FJ374697.1
2B 			DQ177159.2
3B 			DQ177157.2
4B 			EU375596.1
5B 			JN836282.1
6B 			EU375615.1
1B 	B	Argentina	D84497.1
1E 	E		D84500.1
2E 			D84498*
3E 			D84496*
1B 	B	Portugal	DQ072558.1
2B 	F		DQ072577.1
1F 			DQ072567*
2F 	DQ072572*		
1A 	A	Reino Unido	X69497.1
2A 			HQ456784.1
3A 			HQ456791.1
4A 			HQ456805.1
A 	A	Alemanha	AY196339.1
1B 	B		AF531044.1
2B 			AY196334.1
1B 	B	Áustria	AY196331.1
2B 			AY196336.1
3B 			AF531036.1
4B 			AF531031.1

ANEXO 3 – Códigos de identificação das sequências já caracterizadas e subtipificadas
(continuação).

Identificação na árvore filogenética	Subtipo	Localização	Número de Acesso	
5B 	B	Áustria	AF531042.1	
1B 	B	Itália	X69501.1	
2B 			Y13869.1	
B 	B	Turquia	HM639738.1	
1A 	A	Japão	AB515035.1	
2A 			AB515029.1	
3A 			AB515053.1	
4A 			D67048.1	
1B 	B		D37816.1	
2B 			D37814.1	
3B 			D37812*	
4B 			AB515067.1	
5B 			AB515204.1	
6B 			AB515192.1	
7B 			D67064.1	
8B 			M59418.1	
1C 	C		Taiwan	AB083503*
2C 				AB010396*
D1 	D1			D37811*
1D2 	D2			AB515058.1
2D2 		AB515263.1		
3D2 		AB083502*		
C 	C	AB016666*		
A 	A	GU208523.1		
A 	A	Nova Zelândia		EF154050.1
1A 	A	África do Sul		DQ873718.1
2A 			DQ873715.1	
3A 			DQ873722.1	
4A 			DQ873723.1	
5A 			DQ873732.1	
6A 			DQ873719.1	

Nota. * Números de acesso correspondentes às 11 sequências previamente subtipificadas incluídas no alinhamento para garantir a inclusão dos 6 subtipos na árvore filogenética.