

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB  
Departamento de Microbiologia  
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada - LVBA

**GERAÇÃO DE UMA VACINA RECOMBINANTE EXPERIMENTAL CONTRA  
O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA SUBTIPO B (FIV-B) BASEADA  
NO VETOR VIRAL VACCINIA ANKARA MODIFICADO (MVA)**

LUIS ADAN FLORES ANDRADE

2016

LUIS ADAN FLORES ANDRADE

**GERAÇÃO DE UMA VACINA RECOMBINANTE EXPERIMENTAL CONTRA  
O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) BASEADA NO VETOR  
VIRAL VACCINIA ANKARA MODIFICADO (MVA)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais – UFMG.

*Orientador: **Flávio Guimarães da Fonseca***

Belo Horizonte, Julho de 2016.

“O mar calmo não faz marinheiros habilidosos”

Autor desconhecido

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO.....	17
1. O Vírus da Imunodeficiência Felina .....	18
1.1 Os Gatos e o Ser Humano .....	18
1.2 A Família Retroviridae.....	19
1.3 O Vírus da Imunodeficiência Felina .....	20
1.3.1 Partícula Viral e Genoma .....	20
1.3.2 Transmissão e manifestações Clínicas.....	23
1.3.3 Resposta Imune do Hospedeiro ao FIV.....	25
1.3.4 Diagnóstico.....	30
1.3.5 Prevenção e tratamento .....	31
1.3.6 Epidemiologia.....	32
1.3.7 Vacinas contra o FIV .....	34
1.4 Vetores Virais Recombinantes .....	37
1.4.1 Vaccinia Ankara Modificado (MVA) .....	38
1.4.2 Ciclo de multiplicação .....	40
1.4.3 Construção de MVAs recombinantes .....	43
RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	44
OBJETIVOS .....	47
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
1. Estratégia de Trabalho .....	50
2. Amostras de Vírus .....	51
2.1 Obtenção dos vírus MVA/FIV <sup>C2</sup> , MVA/FIV <sup>C3</sup> e MVA selvagem.....	52
2.1.1 Cultivo de células.....	52
2.1.2 Multiplicação viral .....	53
2.1.3 Amplificação Viral .....	53
2.1.4 Purificação viral.....	54

2.1.5 Titulação viral .....	54
2.2 Análises dos vírus MVA/FIV <sup>C2</sup> e MVA/FIV <sup>C3</sup> .....	55
2.2.1 Análise genética dos MVA/FIV <sup>C2</sup> e MVA/FIV <sup>C3</sup> .....	55
2.2.2 Detecção da Proteína FIV/ENV <sup>P</sup> por Western Blot .....	59
3. Avaliação da viabilidade ao longo do tempo de estocagem (shelf-life) do Vírus MVA/FIV .....	61
3.1 Imunomarcação .....	62
4. Predição de peptídeos sintéticos in silico .....	62
5. Imunização em camundongos .....	63
5.1 Os Camundongos .....	63
5.2 O protocolo vacinal .....	63
6. Avaliação in vitro da produção de Interferon $\gamma$ .....	64
6.1 Análise de citocinas intracitoplasmáticas através de citometria de fluxo.....	65
6.2 Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo .....	67
6.3 Ensaio de proliferação celular.....	67
6.3.1 Marcação das células com CFSE.....	68
7. Produção do vírus FIV Petaluma.....	69
7.1 Produção do vírus FIV Petaluma .....	69
7.2 Multiplicação do FIV-Petaluma .....	70
7.2.1 Transfecção de células CRFK com o vetor pFIV-14-Petaluma .....	70
7.2.2 Infecção de Células CRFK.....	71
7.2.3 Verificação Indireta da presença do FIV Petaluma.....	72
7.2.4 Western Blot.....	72
8. Avaliação da Resposta humoral em animais imunizados com MVA-FIV .....	73
8.1 Reconhecimento da proteína FIV/ENV <sup>P</sup> por soro de gatos naturalmente infectados pelo FIV.....	73
8.2 Detecção de anticorpos contra a Proteína FIV/ENV <sup>P</sup> em soro de camundongos imunizados com MVA/FIV .....	74
8.3 ELISA de peptídeos.....	74
9. Análise Estatística.....	75
RESULTADOS.....	76
1. Obtenção dos vírus de trabalho: MVA/FIV, MVA Selvagem e FIV subtipo A .....	77
1.1 Verificação da Presença do inserto nos clones virais.....	77
1.2 Sequenciamento nucleotídico.....	79
1.3 Western Blot.....	85

2. Avaliação da viabilidade ao longo do tempo de estocagem (shelf-life) do Vírus MVA/FIV .....	86
3. Obtenção do vírus FIV Petaluma .....	87
3.1 Transfecção de células CRFK .....	89
3.2 Western Blot de células infectadas com FIV Petaluma .....	90
4. Identificação de Epítomos CD8 <sup>+</sup> para a região V1-V3 da proteína do envelope de FIV .....	91
5. Avaliação da Resposta Imune Celular Específica em animais imunizados com a vacina MVA/FIV .....	92
5.1 Avaliação in vitro dos peptídeos sintéticos .....	92
5.2 Análise da proliferação celular CFSE .....	93
6. Avaliação da resposta humoral após imunização de camundongos com a vacina ..	95
6.1 Avaliação dos peptídeos sintéticos 3 e 6 por meio de ELISA .....	95
6.2 Reconhecimento das proteínas recombinantes produzidas por células infectadas por MVA/FIV <sup>C1</sup> por soro de gatos naturalmente infectados por FIV .....	97
6.3 Reconhecimento de proteínas do FIV Petaluma e MVA/FIV <sup>C1</sup> pelo soro de camundongos inoculados com MVA/FIV <sup>C1</sup> .....	99
DISCUSSÃO .....	101
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## AGRADECIMENTOS

Bom, como dizia o velho ditado: ninguém constrói nada sozinho, a conclusão da minha Tese de Doutorado foi possível pela ajuda de diversas pessoas que participaram e contribuíram de uma forma ou de outra. Venho aqui agradecer...

Em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Flávio. Em 2009 ele aceitou meu pedido de orientação quando eu ainda estava na especialização. De lá pra cá, nesses quase 7 anos de convivência, só tenho a lhe agradecer pela oportunidade, por me abrir as portas do laboratório e por me apoiar nas minhas questões. Muito obrigado, pois você começou como um orientador e acabou como um amigo.

À professora Edel, que sempre foi muito atenciosa e prestativa comigo. Ela esteve presente sempre que precisei de palavras e opiniões de sabedoria. Uma verdadeira mãe dentro do laboratório, que quando participou da minha banca na apresentação do projeto de Mestrado me fez perceber a importância e a responsabilidade que eu tinha nas mãos. A aula que tive com ela quando estava na especialização me inspirou ao ponto de escolher a virologia para trabalhar.

À minha eterna co-orientadora Fabiana Magalhães, a ela eu devo quase todas as técnicas que conheço em virologia. Ela me acompanhou desde o início e me viu crescer na área acadêmica. Cresceu uma grande amizade ao longo desse tempo. Muito obrigado

Ao grupo LVBA (*Old school*). Foi muito bom ter tido a oportunidade de conviver no laboratório na mesma época que a Bárbara Quinan (com grande coração e eficiência impecável no laboratório, me ensinou várias técnicas laboratoriais que desconhecia), Alice Versiani (uma pessoa muito prestativa que com o tempo acabou se tornando uma grande amiga, a quem devo grande parte dos meus resultados), Iracema carvalho (com sua risada contagiosa e tão gostosa de ouvir), Thiago Leão (sempre preocupado com o sucesso dos nossos experimentos e todo um catálogo vivo cheio de protocolos e ideias), Amanda Ferrari (que conseguia contar um caso e tirar risadas de todos os ouvintes), o

meus amigos, Leandro Vida, Vinicius cota, Fernando Reis, Ruiz Astigarraga, Leandro Chinalia, Matheus Laguardia, formamos grandes amizades nesse época, compartilhamos muitas risadas nas horas do almoço e grandes momentos dentro e fora da UFMG. E também gostaria de agradecer às meninas Marcela Gasparini, Lorena Falabella, Danielle Daian, Luciana Carvalho, Jaqueline Contijo, Michelle Paula, Aline Barbosa, Camila Martins, que tornaram minha passagem pelo laboratório muito mais agradável.

À Tânia Mara, não se encaixa nem no LVBA old School, nem à nova geração LVBA. Ela transcende gerações de estudantes. Pessoa muito correta com coração enorme e uma mão abençoada para cozinhar, puxou minha orelha várias vezes, mas isso só me fez crescer. Muito obrigado Tânia.

Aos integrantes da nova geração LVBA, algumas pessoas eu pude conviver com mais tempo, como o Helton Luiz (um grande amigo com quem pude apreciar a companhia nas horas do almoço no bandeirão), Gabriela Melo e Débora Marques (pessoas excelentes com quem pude trocar várias conversas, tomando um café e comendo pão de queijo nas manhãs no restaurante do ICB), outras pessoas eu conheci à pouco tempo, mas foi o suficiente para se tornarem inesquecíveis como foi o caso da Silvia Giannattasio. e em especial a Sabryna Brito, pessoa alegre e espontânea, com a qual instantaneamente senti uma grande afinidade. Aos novatos do laboratório, também quero dizer muito obrigado pela convivência, entre dicas de experimentos e conversas aleatórias seguidas de muitas risadas, passamos um tempo agradável.

Às pessoas que por acaso vão aparecendo na nossa vida, às vezes quando a gente menos espera, mas quando mais precisamos, nesse contexto gostaria de agradecer em especial às minhas alunas de iniciação científica (minhas *Padawans*), Yara e Juliana que me fizeram perceber que ensinar é aprender duas vezes. Também agradeço a todos os amigos que fiz nesse período em que estive na pós-graduação. O convívio com pessoas como a Paulinha, Fabio, Galileu, Poli, Marliete, Rafael, entre outras, me fizeram perceber que estava vivendo uma das melhores épocas da minha vida.

Às parcerias que contribuíram de uma forma ou de outra com a realização deste trabalho: professor Jenner Reis, professor Renato Aguiar, professor



Ricardo Fujiwara e às pessoas do seu laboratório que me ajudaram de diversas maneiras sempre com muita atenção e cuidado. À Daniela Reis e Samara Rabelo, que me ajudaram a trabalhar com citometria de fluxo e a interpretar os dados obtidos. Ambas sempre atenciosas e prestativas. Muito obrigado.

Ao programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do ICB, UFMG, aos seus funcionários que sempre prestativos, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À banca examinadora, por aceitar o convite para avaliar esta Tese de Doutorado,

Às agências financiadoras, CAPES, CNPq e FAPEMIG, sem as quais esse trabalho não seria possível.

Terminados os agradecimentos às pessoas que contribuíram diretamente com a conclusão do meu trabalho, eu gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram a chegar onde estou.

Se diz, que a educação é algo que vem de casa, é por isso que me orgulho em dizer que devo tudo o que sou como pessoa aos meus pais. Eles me ensinaram a ser um cidadão de bem. Me ensinaram a importância do estudo. Meu pai sempre me disse que o conhecimento é algo que uma vez adquirido, ninguém pode nos tirar. Agradeço à minha família, que sempre me apoiou nessa jornada. A você que está lendo meus agradecimentos eu digo que hoje eu sou o que sou, graças à minha família. Provavelmente sou a primeira pessoa da minha família em dedicar tantos anos ao estudo e conseqüentemente obter títulos tão altos em universidade tão prestigiada como a UFMG, mas como disse uma vez Isaac Newton: Se eu pude enxergar mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Organização genômica do FIV e a estrutura da partícula viral	21
FIGURA 02	Manifestações clínicas comumente observadas em infecções por FIV	25
FIGURA 03	Distribuição global dos subtipos do vírus da imunodeficiência felina.	33
FIGURA 04	Morfologia da partícula viral característica dos poxvírus	39
FIGURA 05	Ciclo de multiplicação dos poxvírus	42
FIGURA 06	Fluxo de trabalho simplificado	50
FIGURA 07	Representação das regiões variáveis do envelope do FIV	52
FIGURA 08	Esquema de inoculação dos grupos Mock, MVA selvagem e MVA/FIV.	64
FIGURA 09	Eletoforese em gel de agarose 1% para verificação de presença de vírus recombinantes com a sequência de DNA de interesse	78
FIGURA 10	Eletoforese em gel de agarose 1% para verificação de presença de vírus recombinantes expressando mRNA de interesse	79
FIGURA 11	Sequenciamento nucleotídico do gene exógeno dos vírus MVA/FIV <sup>C1</sup> , MVA/FIV <sup>C2</sup> , MVA/FIV <sup>C3</sup>	84
FIGURA 12	Fotografia do Western Blot para verificar a produção de proteína de interesse pelos vírus MVA/FIV clones 1, 2 e 3	85
FIGURA 13	Foto de Gel de agarose 1% onde é observada a PCR de colônias após a transformação com o plasmídeo pFIV-14-Petaluma seguida de incubação por 24h	88

FIGURA 14	Foto de Gel de agarose 1%, onde é observada a restrição enzimática dos clones bacterianos transformados com o plasmídeo pFIV-14-Petaluma	89
FIGURA 15	Western Blot utilizando como anticorpo primário um <i>pool</i> de soros de gatos naturalmente infectados por FIV	91
FIGURA 16	Estimulação de esplenócitos de camundongo C57BL/6 inoculados com MVA/FIV <sup>C1</sup> e MVA selvagem	93
FIGURA 17	Ensaio de proliferação celular por CFSE	95
FIGURA 18	ELISA de peptídeos sintéticos	96
FIGURA 19	Wester Blot utilizando soro de gatos naturalmente infectados com FIV.	98
FIGURA 20	Western Blot utilizando como anticorpo primário soro de camundongos inoculados com o vírus MVA/FIVC1	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Iniciadores utilizados para amplificar a sequência ENV/v1-v3	58
TABELA 2	Peptídeos FIV sintéticos a serem utilizados no trabalho	65
TABELA 3	Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do p17-p24 do gene <i>gag</i> do FIV	70
TABELA 4	Título do vírus MVA/FIV <sup>C1</sup> liofilizado e não liofilizado.	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BHK-21</b>	Células de rim de filhote de hamster
<b>CA</b>	Capsídeo
<b>CEF</b>	Células de embrião de galinha
<b>CFSE</b>	Carboxi-fluorescente succinimidil éster
<b>CRFK</b>	Célula de rim felino Crandell-Rees
<b>CTL</b>	Linfócitos T citotóxicos
<b>DMEM</b>	Meio Eagle Modificado Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>ENV</b>	Proteína de envelope
<b>FeLV</b>	<i>Feline Leukemia Virus</i> - Vírus da leucemia felina
<b>FIV</b>	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da imunodeficiência felina
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IPTG</b>	Isopropiltiogalactosídeo
<b>LPD</b>	Leite em pó desnatado
<b>LTR</b>	Terminações longas repetidas
<b>LVBA</b>	Laboratório de virologia básica e aplicada
<b>MA</b>	Matriz
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MVA</b>	Vaccinia Ankara Modificado

<b>NC</b>	Núcleocapsídeo
<b>ORF</b>	Janela aberta de leitura
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PBS</b>	Salina-Tampão-Fosfato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PVDF</b>	Fluoreto polivinidileno
<b>RPMI</b>	Roswell park memorial institute
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SIDF</b>	Síndrome da imunodeficiência felina
<b>SU</b>	Proteína de superfície
<b>TM</b>	Proteína transmembrana
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TTBS</b>	Tween-Tris-buffered saline
<b>UFP</b>	Unidade formadora de placas
<b>VACV</b>	<i>Vaccinia Vírus</i>

## RESUMO

Os vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um Retrovírus com impacto global, afetando tanto felinos domésticos quanto selvagens. Este vírus pode causar uma imunossupressão severa e progressiva culminando na morte do felino. Desde a descoberta do FIV, somente uma vacina foi comercializada. Esta vacina tem sua eficiência comprovada contra FIV subtipo A e D, enquanto que para o subtipo B (FIV-B) que é o subtipo circulante no Brasil, ainda não há uma vacina disponível. Tendo em vista que a base de todo programa de prevenção é a vacinação para conseguir uma imunidade efetiva e duradoura, uma vacina eficiente contra o FIV subtipo B é necessária para combater esta virose. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar uma vacina contra o FIV-B usando o vírus *Vaccinia Ankara Modificado* (MVA) recombinante como vetor vacinal expressando a região variável V1-V3 do envelope do FIV-B. Entre as vantagens desta tecnologia sobre as vacinas tradicionais já testadas contra o FIV, podemos destacar: a produção de altos níveis de antígeno recombinante dentro das células, potencial efeito adjuvante, capacidade de induzir tanto resposta celular quanto humoral no hospedeiro entre outras. Neste trabalho, avaliamos a imunogenicidade da vacina em modelo murino. Para isto, camundongos C57BL/6 foram imunizados e após 21 dias receberam uma dose de reforço. Isto induziu a geração de anticorpos contra a proteína do envelope do FIV subtipo B, e que não reconheceram a proteína do envelope do FIV subtipo de A, demonstrando que esta vacina gera uma resposta específica contra o subtipo B. Além disso, foi observado que o soro de gatos naturalmente infectados com FIV, também foi capaz de reconhecer a proteína do envelope do FIV produzida pelo vírus vacinal. Também foi avaliada a resposta imune celular contra epítomos presentes na região V1-V3 do gene do envelope do FIV. Os resultados indicaram a indução de uma boa resposta celular, medida pela proliferação de esplenócitos e produção de IFN- $\gamma$  em modelo murino de imunização. Os dados obtidos neste trabalho nos levam a crer que esta vacina é uma candidata promissora para ser avaliada em gatos e por sua vez, gerar um maior bem estar para estes animais e conforto para os donos. Além do impacto comercial ao entrar em um mercado em plena expansão: o chamado mercado *PET*.

## ABSTRACT

The feline immunodeficiency virus (FIV) is a retrovirus with global impact, affecting both domestic and wild cats. This virus can cause a severe and progressive immunosuppression culminating in the death of the cat. Since the discovery of FIV, only one vaccine has been commercialized. This vaccine has its efficiency proven against FIV subtype A and subtype D, whereas subtype B (FIV-B) which is the subtype circulating in Brazil, has not a vaccine available. The basis of any program of prevention is vaccination to achieve an effective and lasting immunity. So an effective vaccine against FIV subtype B is required to combat this virus. The objective of this study was to develop and evaluate a vaccine against FIV-B using the *Vaccinia Ankara Modified* (MVA) recombinant virus as a vaccine vector expressing the variable region V1-V3 of the FIV-B envelope. Among the advantages of this technology over traditional vaccines already tested against FIV, we can highlight: the production of high levels of recombinant antigen within the cell, a potential adjuvant effect, and the ability to induce both cellular and humoral response in the host. In this work, we evaluated the immunogenicity of the vaccine in mice. For this purpose, mice C57BL/6 were immunized and after 21 days they received a booster dose. We demonstrated the generation of antibodies against the FIV subtype B envelope protein, which do not cross recognize the envelope protein of FIV subtype A, demonstrating that this vaccine generates a specific response against subtype B. In addition, it was observed that the sera from cats naturally infected with FIV were also able to recognize the envelope protein of FIV, produced by the vaccine virus. We also evaluated the cellular immune response against epitopes present in V1-V3 region of the FIV envelope gene. Our results suggested that a good cellular response was induced, as measured by splenocytes proliferation and IFN- $\gamma$  production in a murine immunization model. The data obtained in this study lead us to believe that this vaccine is a promising candidate to be evaluated in cats. This product has the potential to be absorbed into a market in expansion, the so called PET market.



## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### **1. O Vírus da Imunodeficiência Felina**

#### 1.1 Os Gatos e o Ser Humano

Ao longo da evolução, os seres humanos têm domesticado diversos animais, seja para trabalho e transporte (cavalos, asnos, búfalos, etc.), alimentação (vacas, suínos, galinhas, etc.) ou guarda (cães). Os gatos foram domesticados à aproximadamente 10.000 anos AC e não desempenham nenhuma das funções descritas acima, o que leva a acreditar que foram domesticados para serem animais de companhia (DRISCOLL, *et al.*,2009).

A importância de ter um animal de companhia vai além de uma mudança no estilo de vida. Cada vez mais, trabalhos têm apontado que os benefícios de possuir um animal de companhia podem incluir uma melhora para a saúde, tanto por ser um estímulo para fazer algum exercício, quanto psicológicos, por serem uma companhia que ajuda a diminuir a solidão (SERPER, 1991 & JENNINGS, 1997).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) atualmente há 1,56 bilhões de animais de companhia no mundo. O Brasil possui a quarta maior população, com um total de 132,4 milhões de animais, e a segunda maior população mundial de gatos, 22,1 milhões.

Ainda segundo a ABINPET, o mercado mundial *PET* movimentou em 2014 U\$100,4 bilhões e, apesar dos dados de 2015 ainda não terem sido divulgados, é possível observar que o mercado está em expansão. Só os cuidados com a saúde e bem-estar destes animais representaram 33% deste total. Isto se deve ao fato destes animais serem susceptíveis a diversas doenças ao longo de suas vidas, fazendo com que os donos procurem prevenir ou tratar

de maneira adequada estas doenças para que seus animais possam ter qualidade de vida.

Peculiarmente, os gatos possuem uma tendência a uma série de complicações específicas por diversas doenças infecciosas ao longo de suas vidas, seja por verminoses e parasitoses intestinais, doenças fúngicas, bacterianas ou virais, que normalmente são causadas por Calicivírus, Parvovírus, Coronavírus, Herpesvírus e Retrovírus (GREENE, C. E, 1990).

## 1.2 A Família *Retroviridae*

A família *Retroviridae* compreende um grupo muito diversificado de vírus de RNA que causam diversas doenças, neurológicas, tumorais e imunodeficiências que afetam os animais vertebrados. Esta família pode ser subdividida nas subfamílias *Spumaretrovirinae* contendo apenas o gênero *Spumavirus* e *Orthoretrovirinae* que possui 6 gêneros distintos: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Lentivirus* (BURMEISTER, *et al.*, 2001; ICTV, 2014).

Os sete gêneros pertencentes à família *Retroviridae* estão listados a seguir, acompanhados da espécie tipo do gênero: *Alpharetrovirus* - Vírus da leucose aviária (Avian leukosis virus); *Betaretrovirus* - Vírus do tumor mamário dos camundongos (Mouse mammary tumor virus); *Deltaretrovirus* - Vírus da leucose bovina (Bovine leukemia virus); *Epsilonretrovirus* - Vírus do Sarcoma Dérmico de Walleye (Walleye dermal sarcoma virus ); *Gammaretrovirus* - Vírus da leucemia murina, (Murine leukemia virus); *Lentivirus* - Vírus da imunodeficiência humana (Human immunodeficiency virus); *Spumavirus* - *Spumavírus* dos chimpanzés (Simian foamy virus) (ICTV, 2014).

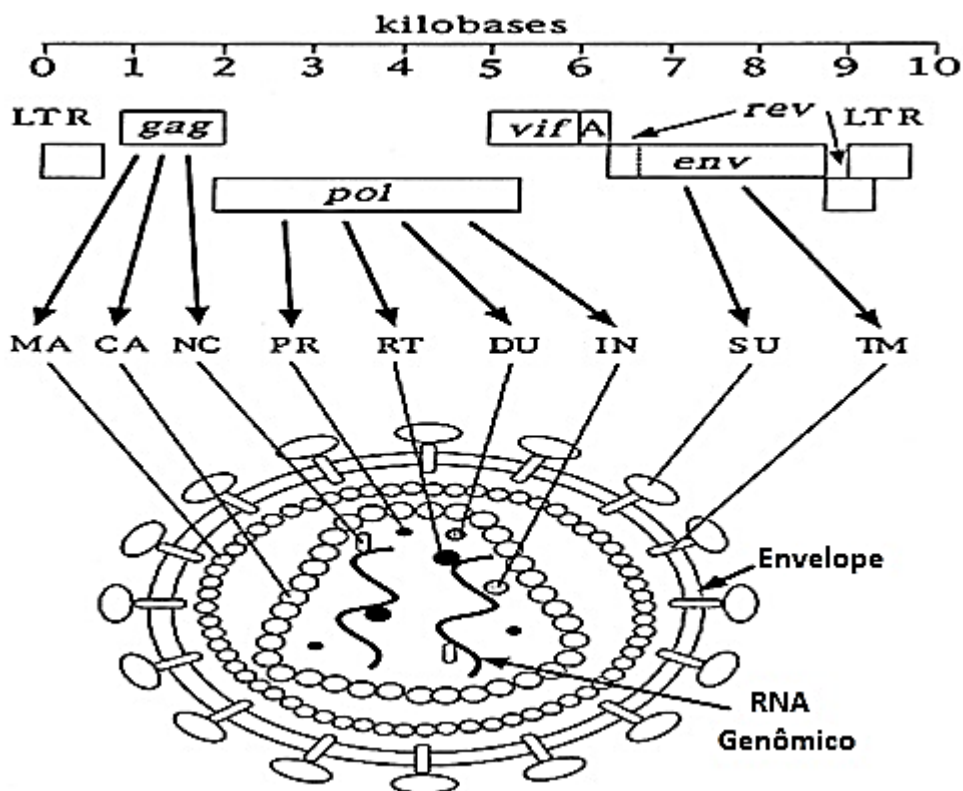
Entre os sete gêneros dessa família, as principais espécies que podem infectar os felinos são o Vírus da leucemia felina (Feline leukemia virus - FeLV), pertencente ao gênero *Gammaretrovirus* e o Vírus da imunodeficiência felina (Feline immunodeficiency virus - FIV), pertencente ao gênero *Lentivirus*. (HARTMANN *et al.*, 2007).

### 1.3 O Vírus da Imunodeficiência Felina

O FIV, inicialmente designado Lentivírus felino T-lymfoftrópico (Feline lymphotropic lentivirus T - FTLV), foi isolado na Califórnia – EUA na década de 1980, a partir de gatos que apresentavam uma variedade de sinais clínicos típicos de desordem imunológica e que eram negativos para o FeLV. Entretanto, os pesquisadores descobriram que a infecção provocada por este vírus estava relacionada com o desenvolvimento de imunodepressão em gatos, e assim, surgiu a denominação Vírus da imunodeficiência felina (FIV) (PEDERSEN *et al.*, 1987).

#### 1.3.1 Partícula Viral e Genoma

O FIV, assim como outros lentivírus, possui uma partícula esférica, apresentando aproximadamente 80 a 100nm de diâmetro. Possui um capsídeo que abriga o material genético, que no caso deste gênero são duas fitas simples de RNA idênticas, não complementares, com polaridade positiva. Junto ao material genético encontram-se as enzimas transcriptase reversa, integrase e a protease. O capsídeo está envolto por um envelope no qual estão inseridas glicoproteínas específicas do vírus tais como gp41 (proteína transmembrana – TM) e gp95 (glicoproteína de superfície- SU) (Figura 1) (MAGNUS *et al.*, 2008; FREED, 1998; ICTV, 2014).



**FIGURA 1: Diagrama da Organização genômica do FIV e estrutural da partícula viral.** O genoma do FIV, assim como outros retrovírus, possui três janelas abertas de leitura (ORF), correspondendo aos genes *gag*, *pol*, e *env*, responsáveis por codificar proteínas estruturais e enzimáticas. O Gene *gag* codifica a matriz (MA), capsídeo (CA) e proteínas do nucleocapsídeo (NC). O gene *pol* codifica protease (PR), transcriptase reversa (RT), desoxiuridina pirofosfatase - dUTPase (DU) e integrase (IN). O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície (SU- gp95) e transmembrana (TM- gp41). Além dessas três ORFs, o FIV possui ao menos três genes acessórios *vif*, *orf-A* e *rev* (INOSHIMA *et al.*, 1998, ELDER *et al.*, 2010).

O genoma do FIV apresenta 9200 pares de bases, possuindo três genes replicativos essenciais, organizados no sentido 5' para 3'. O primeiro gene é o *gag*, que codifica proteínas estruturais do capsídeo viral como matriz, capsídeo e nucleocapsídeo; o segundo é o *pol*, que codifica a transcriptase reversa, a integrase, a protease e a desoxiuridina pirofosfatase – dUTPase, que permite ao

vírus infectar células quiescentes, como os macrófagos; e o terceiro é o gene *env*, que codifica as glicoproteínas transmembrana (TM) e de superfície viral (SU). Na sua forma de provírus, o genoma viral encontra-se flanqueado por terminações longas repetidas (*LTR*) que permitem a sua integração ao genoma celular e nas quais se localizam elementos reguladores da iniciação da transcrição viral (KATZ & SKALKA, 1990; ALCAMI, 2008; ICTV, 2014).

Além desses três genes estruturais comumente encontrados em todos os lentivírus, o FIV possui três genes adicionais, que incluem: fator de infectividade viral (*viral infectivity factor - vif*), A janela de leitura aberta A (Open reading frame - *orf-A*) e regulador de expressão viral (*Regulator of Virion Expression - rev*) (GEMENIANO *et al.*, 2003).

O gene *vif* codifica uma proteína de aproximadamente 23 a 29 kDa associada ao aumento da infectividade viral. Estudos utilizando vírus mutantes *vif* defectivos demonstraram uma redução significativa em sua infectividade (TOMONAGA & MIKAMI, 1996; GEMENIANO *et al.*, 2003).

O *orf-A*, também chamado de *orf-2*, possui uma função ainda não totalmente esclarecida. Análises da sequências do sítio *orf-A* demonstraram que este gene codifica uma proteína de 79 aminoácidos e que sua região terminal é rica em cisteínas, similarmente ao gene *tat* presente em outros lentivírus como o HIV. Assim, baseado no seu tamanho, na sua localização no genoma e na semelhança ao gene *tat* acredita-se que o *orf-A* também possa exercer função de transativador transcricional (KAWAGUCHI *et al.*, 1995; TOMONAGA & MIKAMI, 1996; GEMENIANO *et al.*, 2003).

O gene *rev* de FIV codifica uma proteína de 23 kDa localizada no nucléolo das células infectadas e possui uma atividade muito similar ao *rev* encontrado em Lentivírus que infectam primatas, onde atua na exportação nuclear dos RNAs mensageiros (TOMONAGA & MIKAMI *et al.*, 1996; LEVIN *et al.*, 2009).

Como um dos principais genes e elementos regulatórios do FIV, pode-se destacar o gene codificador da Desoxiuridina pirofosfatase (DU), que é uma enzima característica dos Lentivírus que não infectam primatas. O DU catalisa a conversão do dUTP em dUMP e mantém uma baixa relação dUTP/TTP,

minimizando a incorporação de uracila no DNA. Estudos prévios utilizando mutantes defectivos para DU mostraram que estes vírus conseguiram se multiplicar e manter a infectividade em células de Fibroblasto felino (*feline fibroblastic cell line* - CRFK), no entanto, estes vírus não foram capazes de multiplicar eficientemente “*in vitro*” em macrófagos primários. Por isso, os vírus defectivos para DU, são capazes de infectar e se disseminar na maioria dos tecidos de gatos, porém, o título viral é menor do que em gatos infectados com o vírus selvagem, particularmente em órgãos como baço e glândula salivar (INOSHIMA *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Transmissão e manifestações Clínicas

Os principais parâmetros que influenciam na infecção pelo FIV estão relacionados com o seu modo de vida (acesso do animal a ambientes externos e contato com outros animais “de rua”), ao sexo e a idade (LUTZ, 1990; SPARGER, 1993).

A via mais comum de transmissão do FIV é através de mordidas provocadas durante brigas que ocorrem entre gatos, principalmente, na luta por território. Desta forma, os animais mais frequentemente infectados são machos, adultos, e os que vivem nas ruas (YAMAMOTO *et al.*, 1988; COURCHAMP & PONTIER, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Foi demonstrado ocorrência de transmissão via intramuscular, endovenosa, subcutânea, intraperitoneal, iatrogênica, durante a gestação, por transmissão intrauterina, perinatal, pelo leite ou sêmen (BURKHARD & DEAN, 2003; NORRIS *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

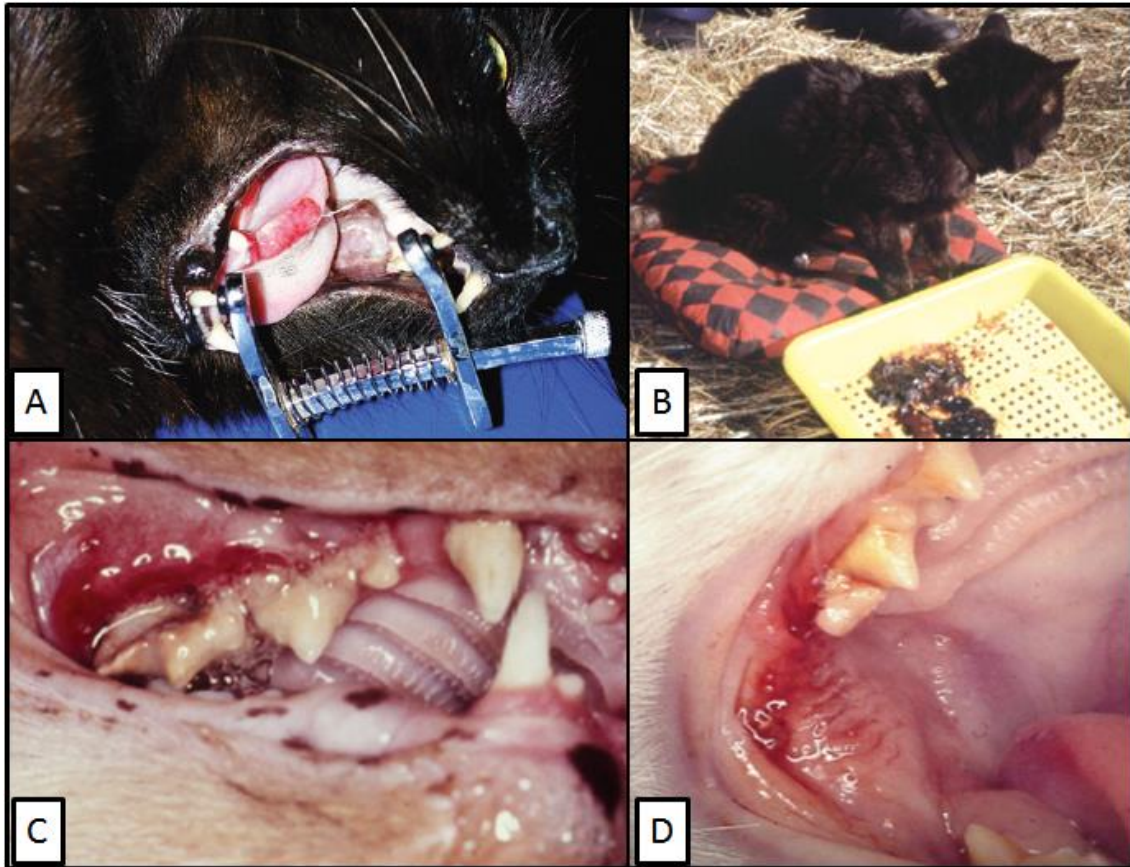
Uma vez infectado, o animal pode permanecer assintomático, ou apresentar desordens hematológicas, neuropatologias e deficiência imunológica, tornando-se susceptível a infecções secundárias (CALDAS *et al.*, 2000; FLETCHER, *et al.*, 2008).

Segundo Caldas e colaboradores (2000) esta susceptibilidade a infecções secundárias é decorrente do tropismo do FIV por linfócitos TCD4+ e TCD8+, linfócitos B e células do sistema nervoso central, o que causa a doença denominada Síndrome da Imunodeficiência Felina (SIDF). Esta enfermidade caracteriza-se por um longo período de incubação, com evolução lenta e progressiva e aparecimento tardio dos sinais clínicos.

A infecção por FIV pode ser dividida em três estágios: O primeiro estágio caracteriza-se por um período de viremia que pode durar várias semanas, apresentando linfadenopatia generalizada, febre e neutropenia; o segundo estágio, considerado subclínico ou assintomático, caracteriza-se por um longo período de incubação que pode durar vários anos, durante os quais ocorre uma redução gradativa dos linfócitos T CD4+. No estágio terminal a imunodepressão é evidente, com manifestações clínicas decorrentes de infecções oportunistas como febre recorrente, perda de peso, alterações de comportamento não específicas, infecções crônicas da cavidade oral e do trato respiratório caracterizando o quadro clínico de SIDF (CALDAS *et al.*, 2000).

As infecções secundárias associadas ao FIV são: gengivites e estomatites crônicas, conjuntivites, candidíase, toxoplasmose, otite externa, piodermite, periodontite, micobacterioses, sarna, criptococose, infecção por *Mycoplasma felis* e *Streptococcus canis* (FIGURA 2) (HOPPER *et al.*, 1991).





**FIGURA 2: Manifestações clínicas comumente observadas em infecções por FIV:** A) Gingivite provocada por infecções oportunistas B) Perda de peso e enterite hemorrágica. C) Doença periodontal grave. D) Gengivoestomatite grave (Adaptado de HOSIE *et al.*, 2009)

### 1.3.3 Resposta Imune do Hospedeiro ao FIV

Nas infecções provocadas pelo FIV existe um paradoxo imunológico, uma vez que ocorre uma rápida e robusta resposta imune antiviral que não consegue ser mantida, seguida por uma supressão imune progressiva que, eventualmente, resulta na Síndrome da Imunodeficiência Felina (SIDF) (TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

Para melhor elucidação, a sequência de eventos que resultam neste paradoxo imunológico foi dividida em quatro partes: resposta humoral, resposta celular, supressão imune e hiperativação imune.

#### a) Resposta Humoral

Após a infecção, o sistema imune do felino gera uma intensa resposta de células T e B contra o FIV. A resposta humoral contra FIV consiste na rápida produção de anticorpos neutralizantes anti-FIV pelas células B após a ativação de células T CD4. Tanto as células B quanto as células T participam no controle das infecções provocadas pelo FIV, visando prevenir a interação da partícula viral contra novas células alvo (LECOLLINET & RICHARDSON, 2008).

A partícula viral possui vários epítomos que são reconhecidos pelo sistema imune para que seja dado início à resposta humoral. Entre eles podemos destacar epítomos da proteína Gag, a proteína de superfície e a proteína transmembrana do envelope viral. A proteína de superfície do FIV apresenta uma variação considerável de aminoácidos em sua sequência, com um consenso de cinco regiões variáveis (V) V1 até V5. Dentre esses domínios, a região variável 3 (V3), 4 (V4) e 5 (V5) parecem ser os principais alvos dos anticorpos neutralizantes (SAMMAN *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2010).

Devido à alta taxa de mutação que ocorre durante o ciclo de multiplicação do FIV há a produção de progênies virais diversificadas. Estas partículas são denominadas “*quasispecies*”. A complexidade destas novas partículas influencia tanto na resposta celular quanto a humoral. Utilizando o HIV como exemplo, o gene do que codifica o envelope, pode variar em até 10% entre as “*quasispecies*” e estas mutações ocorrem principalmente nas regiões variáveis, o que dificulta para os hospedeiros, a produção de anticorpos com ampla atividade neutralizante favorecendo, dessa forma, o escape do vírus (KRAASE *et al.*, 2010). Em relação às regiões variáveis, foi descrito por Siebelink e colaboradores (1995), que anticorpos neutralizantes contra a região V5 são capazes de impedir a continuidade do ciclo de multiplicação viral, porém esta região é um “*Hotspot*” para mutações, e uma variação mínima de aminoácidos é o suficiente para

reduzir substancialmente ou completamente a capacidade de neutralização da resposta humoral do hospedeiro.

A região V4 é também um importante alvo para anticorpos neutralizantes, porém foi verificado que nesta região a mudança de um único aminoácido é o suficiente para tornar um vírus sensível à neutralização em um vírus resistente (KRAASE *et al.*, 2010).

A região V3, além de ser alvo de anticorpos, tem um papel importante na ligação da partícula viral com o co-receptor CXCR4 de superfície celular. A região responsável por esta ligação apresenta aminoácidos que são conservados entre mais de 200 sequências de envelope de FIV analisadas no Genbank. Esta região é denominada Região N44 e é composta por nove aminoácidos (SSWRQKNRW) dos quais os mais conservados são dois triptofanos (entre 98 a 100% conservados), uma lisina (55% conservada) e duas argininas (73 a 79% conservadas) (HU *et al.*, 2010).

A importância da região V3 para a ligação do FIV ao co-receptor celular CXCR4, pode limitar a magnitude das possíveis mutações que podem ocorrer nesta região, uma vez que essa mutação por ser deletéria pode impedir a entrada do vírus na célula hospedeira. Esta peculiaridade torna a região V3 um excelente alvo para anticorpos neutralizantes contra o FIV. Tal fato, pode ser corroborado pelo trabalho de Bendinelli e colaboradores (1995), onde foi detectado anticorpos contra a região V3 em 100% de gatos infectados por FIV.

Contudo, o papel desses anticorpos neutralizantes no controle do vírus ainda é controverso. Alguns trabalhos sugerem que os anticorpos não estão relacionados com a redução da progressão viral, pois, os títulos foram similares tanto em gatos sintomáticos, quanto nos assintomáticos. Porém, os gatos que não apresentavam títulos detectáveis de anticorpos tiveram uma progressão da doença muito mais rápida. Interessantemente, estudos utilizando a transferência passiva de soro de gatos vacinados ou de gatos infectados com FIV, protegeu os gatos que nunca tiveram contato prévio com o vírus após o desafio (TOMPKINS & TOMPKINS, 2008)

## b) Resposta Celular

A indução de uma resposta celular específica para o vírus parece ser a chave para o controle da infecção viral. Trabalhos como os de Yamamoto e colaboradores (2002), Uhl e colaboradores (2008) e Hood e colaboradores (2015), reforçam a ideia que o braço forte da resposta celular é atribuído as Células T CD4 auxiliares (Th) e linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTLCD8+), que reconhecem, principalmente epítomos das proteínas produzidas pelos genes *gag* e *env*.

Foi demonstrado que a atividade citotóxica CD8+, antígeno-específica e restrita ao complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I), está relacionada com o declínio da viremia no plasma. Apesar de ser detectada somente duas semanas após a infecção, ela permanece alta na fase aguda por, aproximadamente, vinte e uma semanas, diminuindo quando o gato desenvolve a SIDF (OMORI *et al.*, 2004; TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

A resposta celular geralmente não é suficiente para eliminar completamente o vírus do hospedeiro e, por isso, com o decorrer da infecção o felino infectado passa da fase assintomática para uma expressiva supressão imune, pelo esgotamento de células TCD4+ e atividades CTL. O que torna a progressão desta doença bastante similar à observada no caso da infecção pelo HIV-1 em seres humanos (YAMAMOTO *et al.*, 1988; LECOLLINET & RICHARDSON, 2008).

## c) Supressão Imune

Como mencionado, anteriormente, a robusta resposta imune gerada contra o FIV reduz a carga viral no plasma, porém o vírus não é totalmente destruído provocando uma disfunção imune progressiva evidenciada primeiramente, pela perda da resposta aos antígenos virais, seguida pela perda de respostas mitogênicas. Esta disfunção, conseqüentemente, acarreta a inabilidade de desenvolver uma resposta imune primária para patógenos oportunistas. O desenvolvimento de infecções secundárias pode ser atribuído ao declínio no número de células CD4+, o que provoca uma redução na produção

de citocinas, como a interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (INF- $\gamma$ ), as quais são necessárias para uma resposta imune bem sucedida, mediada por células (UHL *et al.*, 2008; ELDER, *et al.*, 2008; TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

Especula-se que ocorra uma ativação de células LTCD4+ regulatórias, denominadas de células treg, durante a fase de infecção do FIV. Essa ativação suprime a resposta imune mediada por células T, antes que as populações de células TCD4+ e TCD8+ possam se expandir e desenvolver uma resposta imune efetiva. O agravamento dessa supressão imune, considerada uma característica comum das infecções provocadas pelo FIV, pode contribuir com o processo infeccioso e com desenvolvimento de antigenemia crônica (TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

#### d) Hiperativação Imune

Paradoxalmente à supressão imune, ocorre uma hiperativação das células B e T do início ao fim da infecção. A hiperativação de células B é manifestada como uma hipergamaglobulinemia policlonal. Este evento é observado em infecções naturais e experimentais nas quais o felino desenvolve uma resposta policlonal IgG que pode ser detectada 6 semanas pós-infecção utilizando antígenos virais e não virais e pode permanecer por vários meses (HOSIE & BEATTY, 2007; TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

Pode ocorrer hiperativação tanto de células T CD4+ quanto de células T CD8+. A linfocitose de células TCD8+ ocorre durante a fase aguda da infecção e se mantém até os estágios mais avançados da doença. A análise fenotípica das células TCD8+ circulantes em gatos FIV positivos demonstrou um decréscimo na expressão da cadeia CD8 $\beta$ , um aumento das moléculas MHC classe II e uma progressiva regulação negativa do marcador de superfície CD62L que não está presente em células T ativadas. A diminuição de CD62L (70%) e o aumento da expressão de moléculas de adesão (CD44) e integrinas (CD49d, CD18) na superfície das células CD8+ caracterizam um fenótipo de ativação. Tal fato sugere que as células CD8+ não ativadas são amplamente substituídas, por células ativadas, durante a infecção por FIV (BUCCI *et al.*, 1988; WILLET *et al.*,

1993; GEBHARD *et al.*, 1999; TOMPKINS & TOMPKINS, 2008). Em relação às células TCD4+ foi observada uma condição similar ao descrito para Linfócitos TCD8+. Após a infecção pelo vírus observou-se um aumento de 80% de células TCD4+CD26L- sugerindo a ocorrência do fenótipo de ativação (TOMPKINS & TOMPKINS, 2008).

#### 1.3.4 Diagnóstico

O diagnóstico das infecções provocadas pelo FIV é feito pela associação do exame clínico, geralmente inconclusivo, com exames laboratoriais complementares (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Os métodos de detecção podem ser diretos ou indiretos. Entre os métodos diretos de detecção destacam-se:

##### - Isolamento Viral

O isolamento viral é um método não utilizado no diagnóstico de rotina. A detecção do vírus no plasma ou linfócitos do sangue periférico de animais infectados pelo isolamento viral em culturas de células é possível durante todo o período da infecção. Os linfócitos do sangue periférico fresco são subcultivados com células T primárias de felinos por duas a três semanas e a presença do vírus é confirmada medindo os níveis de proteínas virais na cultura (HOSIE *et al.*, 2009).

##### - Ensaios que detectam o DNA proviral

Estes ensaios variam muito em desempenho e podem ser inferiores aos testes sorológicos com sensibilidades e especificidades variando de 40 a 100%. Atualmente, os ensaios de PCR detectam eficientemente o FIV-A, mas, os outros subtipos possuem mais variabilidade genética. Essa variabilidade pode explicar

resultados discrepantes quando amostras idênticas são enviadas para laboratórios distintos (HOSIE *et al.*, 2009; Fung-Martel *et al.*, 2013).

Entre os métodos indiretos de detecção destacam-se:

#### - Detecção de anticorpos

São testes rotineiros para FIV, que detectam anticorpos que reconhecem estruturas virais (como por exemplo, a proteína do capsídeo p24 e o peptídeo Gp41). Os ensaios mais comumente utilizados são ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e teste de imunocromatografia. O teste Western Blot é considerado padrão ouro para a sorologia de FIV e é usado para confirmar resultados inconclusivos (HOSIE *et al.*, 2009; Fung-Martel *et al.*, 2013).

#### - Contagem de Linfócitos T CD8+ e CD4+

É possível determinar o estágio e disfunção imune através da contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. No entanto, devido a seu custo, estes ensaios geralmente não são utilizados nas clínicas veterinárias (HOSIE *et al.*, 2009).

### 1.3.5 Prevenção e tratamento

Algumas medidas simples de prevenção devem ser tomadas para evitar que os gatos adquiram o FIV, tais como, evitar o contato de gatos domésticos com gatos de rua, castração para diminuir as saídas e brigas entre os animais, testar sempre os gatos estando doentes ou não e, isolar os animais doentes dos demais animais (HOPPER *et al.*, 1991; HOSIE *et al.*, 2009).

Além destas medidas preventivas é essencial que seja realizado um rápido diagnóstico, em caso de suspeita de infecção, para permitir que também seja realizada uma rápida intervenção.

Entre os tratamentos para FIV, são utilizados produtos recombinantes humanos, como citocinas, eritropoietina, fatores de crescimento. A função destas drogas é aumentar a contagem de neutrófilos, restaurar a condição anêmica e aumentar o tamanho do timo, para repor o pool de células T respectivamente (HOSIE, *et al.*, 2009).

Algumas drogas antivirais para tratar a imunodeficiência humana, podem ser utilizadas no tratamento da imunodeficiência felina. A droga mais comumente utilizada é o AZT (3'-azido-2',3-dideoximitina). Este medicamento é um análogo de nucleotídeo que atua no bloqueio da enzima transcriptase reversa, impedindo a multiplicação do FIV. Embora ainda não esteja sendo comercializada, a AMD3100, tem provado atuar como antagonista do coreceptor CXCR4, inibindo assim, a entrada viral na célula hospedeira, reduzindo estatisticamente os sintomas clínicos e a carga viral. Os interferons são conhecidos por serem citocinas com capacidade antiviral, antitumorais e imunomodulatórias, no tratamento contra o FIV, podem ser utilizados Interferon felino ômega, para aumentar a expectativa de vida do gato infectado (Hosie, *et al.*, 2009; Horzinek *et al.*, 2013).

### 1.3.6 Epidemiologia

Os estudos baseados na diversidade genética da região V3–V5 do gene envelope (*env*) e na região p17-p24 do gene *gag*, demonstraram a ocorrência de cinco subtipos diferentes de FIV, designados A, B, C, D, E com cerca de 30% de diversidade entre cada subtipo (KAKINUMA *et al.*, 1995; DUNHAM, 2002; HOSIE & BEATTY, 2007; HOSIE *et al.*, 2009).

O subtipo A é distribuído mundialmente, mas, é predominantes no oeste dos Estados Unidos, norte do Japão, Alemanha e África do sul (DUARTE & TAVARES, 2006). O subtipo B também está distribuído globalmente, porém tem sido constantemente identificado ao leste do Japão, Itália e Portugal, centro oeste dos Estados Unidos e no Brasil (DUARTE *et al.*, 2002; CAXITO *et al.*, 2006; PHADKE *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012). O subtipo C é incomum, ocorrendo



em pequenos grupos de gatos do Canadá, Alemanha e Japão (NAKAMURA *et al.*, 2003). Já o FIV subtipo D, foi isolado principalmente na região leste do Japão e o subtipo E só foi detectado em duas amostras na Argentina (Figura 3) (DUARTE & TAVARES, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2012).



**FIGURA 3: Distribuição global dos subtipos do vírus da imunodeficiência felina.** Fonte: HOSIE, *et al.*, 2009.

Estudos epidemiológicos mostram uma ampla distribuição mundial do FIV, com taxas de prevalência variando desde 2,5% até 44% em diferentes regiões (LARA *et al.*, 2007).

Um estudo de prevalência do FIV feito, em 2005, por Troyer e colaboradores, examinou 3055 espécimes de 35 espécies de felinos e 3 espécies de Hienas (família *Haenidae*) pelo método de Western Blot e pela Reação em Cadeia pela Polimerase (Polymerase Chain Reaction- PCR), amplificando sequências *gag* e *pol*. Os resultados mostraram que 19 espécies foram soro-positivas para FIV. Este Lentivírus acomete a maioria das espécies de felídeos do novo mundo, incluindo o ocelote (*Leopardus pardalis*), puma

(*Puma concolor*), onça (*panthera onca*), margay (*Leopardus weidii*) e tigrina (*Leopardus tigrina*), assim como grandes felinos africanos como leão (*Panthera leo*), guepardo (*Acinony jubatus*), leopardo (*Panthera pardus*), além de outros carnívoros como a hiena manchada (*Crocuta crocuta*).

Segundo Troyer e colaboradores (2005), esses achados sugerem que a distribuição mundial de FIV não é uniforme, sendo endêmicos na maioria dos felinos da África e nas Américas. O que levou estes pesquisadores a sugerir que o FIV surgiu na África, ao invés da Ásia.

Segundo Lara e colaboradores (2007), no Brasil, as taxas de prevalência do FIV reportadas variam entre 3,7 e 37,5%, sendo os menores valores relatados em gatos assintomáticos e os maiores valores em animais doentes.

Embora a identificação dos subtipos circulantes é essencial para desenvolver estratégias de desenvolvimento de vacinas e diagnósticos (TEIXEIRA *et al.*, 2012), no Brasil pouco se conhece sobre a diversidade genética do FIV. Até o momento estudos feitos por pesquisa filogenética e sorológica nos Estados de Rio Grande do Sul (CALDAS *et al.*, 2000), Rio de Janeiro (SOUZA *et al.*, 2002), Minas Gerais (CAXITO *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007) e São Paulo (LARA *et al.*, 2007), detectaram o subtipo B como único circulante no território nacional, apresentando uma prevalência que varia de 2 a 37% dos gatos examinados.

### 1.3.7 Vacinas contra o FIV

Desde sua descoberta em 1986, numerosas tentativas de desenvolver uma vacina eficiente contra FIV foram feitas. Apesar de grandes investimentos, o sucesso para o desenvolvimento de vacinas para este lentivírus tem sido limitado e em alguns casos o uso de vacinas lentivirais experimentais provou ser pouco produtivo, uma vez que, os indivíduos vacinados se tornaram mais susceptíveis à infecção (HUISMAN *et al.*, 2008B).

Um dos primeiros registros de aumento de infecção após a vacinação contra FIV foi em 1992 por Hosie e colaboradores. Os gatos que foram vacinados

com preparações de ISCOM (complexo imunoestimulatório) contendo partículas de Gag recombinante, assim como vacinas com formaldeído ou glicoproteína Env, se tornaram virêmicos entre duas a três semanas antes que os gatos do grupo controle. Além do mais, todos os gatos vacinados tornaram-se virêmicos após o desafio, exceto o grupo controle (HUISMAN, *et al.*, 2008A).

Em outro estudo, foi utilizada uma vacina baseada em um peptídeo sintético que representava um epitopo linear da alça V3 da proteína do envelope do FIV, junto com o adjuvante de Freund. Esta vacina induziu anticorpos neutralizantes virais porém, predispôs os gatos a uma acelerada replicação viral (LOMBARDI, *et al.*, 1993; HUISMAN, *et al.*, 2008A).

Muitas outras vacinas foram desenvolvidas baseadas no sucesso da vacina contra Vírus da leucemia felina (*Feline leukemia virus* - FeLV), utilizando um vírus inteiro inativado ou células infectadas com vírus inativado. Vacinas utilizando vírus atenuado não são recomendadas para FIV, devido ao risco de ocorrer uma recombinação com o vírus selvagem, resultando em uma reversão do vírus vacinal para tipo selvagem (UHL *et al.*, 2008).

Embora controversa, a vacina experimental mais bem sucedida contra FIV foi uma vacina utilizando o vírus inteiro quimicamente inativado composta por dois subtipos de FIV, o subtipo A (FIV<sub>pet</sub>) e o subtipo D (FIV<sub>shi</sub>) (HUISMAN, *et al.*, 2008A). Esta vacina com o nome comercial de FIV Fel-O-Vax® foi aprovada para liberação comercial nos Estados Unidos em 2002, culminando uma pesquisa de dez anos. Segundo autores, a imunização não requer uma dose de reforço antes do desafio e 84% dos gatos vacinados ficaram protegidos contra o desafio utilizando um vírus heterólogo um ano após a vacinação (HUANG *et al.*, 2010).

Nos testes desta vacina, a imunização consistiu de três doses de 1ml administradas por três semanas no grupo vacinal. Os gatos possuíam entre sete e oito semanas de idade. O grupo testado apresentou título máximo de anticorpos anti-FIV entre sete a vinte e um dias após a última vacinação. Após este período o título de anticorpos diminui até permanecer em um nível de estabilidade, o qual manteve-se por doze meses. Essa vacina também foi eficaz contra os FIV-A que possuem entre 9 a 20% de divergência na sequência do envelope em relação aos vírus vacinais. Outros estudos sugeriram que esta

vacina pode conferir proteção contra altos títulos de um inoculo de vírus homólogos e contra baixos títulos de heterólogos, no caso FIV B (FIV bang), embora alguns trabalhos afirmem que esta vacina não protege contra o subtipo B (PU *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2010; WESTMAN, *et al.*, 2016).

14 anos após a liberação da vacina FIV Fel-O-Vax® contra FIV, o mecanismo com que ela confere imunidade contra alguns subtipos permanece incerto. Isto leva ao seguinte questionamento: Por que algumas vacinas protegem e outras aumentam susceptibilidade tornando os animais virêmicos de forma mais rápida que o grupo controle? Estudos vêm levantando pistas que podem nos conduzir à resposta.

Primeiro, deve-se observar que as primeiras tentativas de desenvolvimento de uma vacina eficiente focaram na indução de anticorpos antivirais específicos (HUISMAN *et al.*, 2008A).

A maioria destes anticorpos é gerada contra os epítomos localizados na superfície do envelope e na região transmembrana. Estas regiões (como descrito anteriormente) possuem sítios de ligação permitindo a entrada do vírus (regiões V1, V2 e V3) e regiões de alta variabilidade como as regiões V3, V4 e V5 cujas variações torna difícil para a maioria dos hospedeiros a produção de anticorpos com ampla atividade neutralizante. Favorecendo dessa forma, a multiplicação viral, pois, com o advento de modificações acumuladas por esses vírus, os anticorpos perdem a especificidade, diminuindo a capacidade de neutralização (UHL *et al.*, 2008).

Utilizando o HIV como exemplo, um teste fase III usando uma vacina de Env recombinante (gp120), não demonstrou nenhuma proteção contra a infecção HIV-1, porém, esta vacina induziu anticorpos neutralizantes específicos dos quais somente alguns foram capazes de neutralizar isolados primários. Tal fato demonstra a ineficiência da imunização que objetiva a produção de anticorpos (RICHARDSON, *et al.*, 2002; UHL *et al.*, 2008).

Em relação ao FIV, este tipo de imunização pode levar ao aumento da infecção, devido à ativação imune e expansão de células apresentando CD134, que é o receptor primário para FIV, sendo que sua expressão é estritamente

confinada a células T CD4+. Assim, como as células T CD4+ constituem o maior alvo para a infecção primária de FIV, sua expansão pela vacinação pode oferecer ao vírus uma oportunidade ideal para sua multiplicação. Além do mais, a molécula co-receptora de FIV, a CXCR4, é expressa em células B ativadas e monócitos, e foi demonstrado que o aumento da expressão de CXCR4 em linhagens celulares resulta no aumento da multiplicação de FIV *in vitro* (HUISMAN, *et al.*, 2008A).

Com estes dados tem se tornado claro que a geração de imunidade apenas por produção de anticorpos não é o melhor mecanismo para inibir a infecção viral. Diversos estudos sugerem que a melhor forma de combater o FIV é por meio da imunidade celular e, em particular, através dos linfócitos T citotóxicos (CTL) que contribuem para controlar a infecção dos lentivírus (WESTMAN *et al.*, 2016).

Para a indução de respostas CTL, sistemas especiais de entrega de antígenos são requeridos para direcionar as proteínas de interesse em rotas endógenas de processamento de antígenos via MHC classe I. Os vetores virais recombinantes completam esse requisito, pois são capazes de induzir respostas CTL contra as proteínas de interesse que estão sendo expressas. Exemplos de vetores recombinantes incluem o Vírus da floresta Semliki (*Semliki Forest Virus* -SFV) e poxvírus com ciclo de multiplicação deficiente como o Vaccinia Ankara Modificado (*Modified Vaccinia Ankara* - MVA), os dois têm sido utilizados com sucesso para induzir imunidade celular contra várias infecções virais (HUISMAN, *et al.*, 2008A).

#### 1.4 Vetores Virais Recombinantes

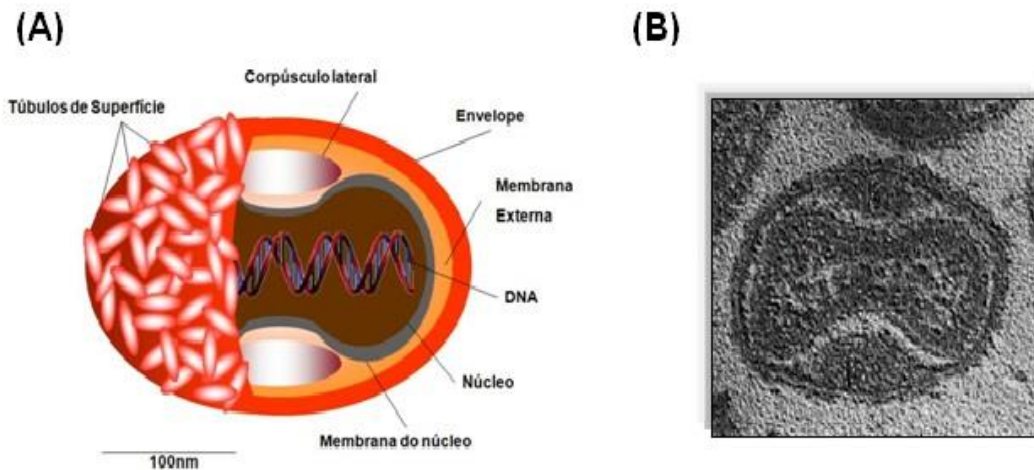
A utilização de vetores recombinantes como estratégia de vacinação possui inúmeras vantagens sobre as tecnologias tradicionais. Entre elas: destacam-se altos níveis de produção do antígeno recombinante dentro das células do hospedeiro imunizado; potencial efeito adjuvante pelas próprias proteínas do vetor; capacidade de liofilização, permitindo o armazenamento sem equipamentos especializados de refrigeração; possibilidade de infecção direta

de células apresentadoras de antígenos, evitando assim, etapas prévias de apresentação; e a capacidade de induzir não só a resposta humoral como também a resposta celular (ROCHA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005).

Mesmo que a maioria dos genomas virais possa ser manipulada para se tornar recombinante e expressar antígenos exógenos na célula hospedeira, alguns vírus são mais eficientes e atraentes para serem usados como vetores vacinais, induzindo respostas imunes mais eficientes. Dentre esses, os membros da família *Poxviridae* são um dos vetores virais melhor caracterizados e mais comumente utilizados para o propósito vacinal (ROCHA *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2005; ERTL, H. C. J, 2016).

#### 1.4.1 Vaccinia Ankara Modificado (MVA)

O Vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), corresponde a uma amostra do vírus vaccinia (*Vaccinia vírus* – VACV). Este vírus pertence à família *Poxviridae*, caracterizada por vírus grandes e envelopados que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira, seu genoma é constituído de DNA linear cujo tamanho pode variar entre 130-360 kb codificando aproximadamente 150 genes. Estes vírus apresentam uma forma ovóide ou tijolo com dimensões de aproximadamente 360 x 270 x 250nm. A estrutura da partícula é complexa, consistindo de uma membrana lipídica denominada membrana externa contendo túbulos de superfície arranjados de forma irregular em sua superfície, que envolve um cerne e dois corpúsculos laterais. O cerne apresenta-se em forma de halter e possui uma membrana que circunda o material genético, enzimas e fatores de transcrição para genes precoces. Os corpúsculos laterais localizam-se nas concavidades do cerne e sua função pode estar relacionada a liberação de fatores imunomoduladores (FIGURA 4) (BULLER & PALUMBO, 1991; DAMON, 2007; MOSS, 2007; BIDGOOD & MERCER, 2015).



**FIGURA 4: Morfologia da partícula viral característica dos poxvírus.** (A) representação esquemática de um poxvírus. (B) Fotografia por microscopia eletrônica de detecção longitudinal de um vírus *Vaccinia* (*Vaccinia virus* - VACV). Fonte: adaptado de FENNER, 1989; [www.smbs.buffalo.edu](http://www.smbs.buffalo.edu).

O MVA foi atenuado pela passagem seriada por mais de 500 vezes em fibroblastos de embrião de galinha. Seu nome se deve ao fato de que o vírus parental foi isolado de uma lesão de um cavalo em Ankara, na Turquia (BLANCHARD *et al.*, 1998).

Durante sua atenuação, o MVA sofreu uma perda de aproximadamente 12% do seu genoma, totalizando aproximadamente 30kb, resultando assim na perda total de 26 ORFs junto com a fragmentação de mais 21 ORFs, além de numerosas mutações de pequena escala. Assim, os MVAs não expressam muitos dos fatores de evasão imune e virulência conhecidos nos poxvírus como receptores de interferon- $\gamma$  e interferon  $\alpha/\beta$  e quimiocinas. Além do mais, o MVA sofreu deleções que interferiram de maneira abortiva seu ciclo de multiplicação, diminuindo sua gama de hospedeiros e tornando-o incapaz de causar infecção disseminada, inclusive em animais imunodeprimidos (COTTINGHAM *et al.*, 2008; GILBERT, S. C., 2013).

O MVA foi usado nos estágios finais da campanha de erradicação da varíola, sendo administrado de forma intracutânea, subcutânea e intramuscular em mais de 120.000 pessoas no sul da Alemanha e Turquia, e nenhum efeito colateral significativo foi reportado (BLANCHARD *et al.*, 1998).

Ainda segundo Blanchard e colaboradores (1998) o vírus MVA é um candidato promissor a vacinas, devido a seu restrito espectro de hospedeiros, imunogenicidade e avirulência em modelos animais e seu excelente prognóstico de segurança como vacina para varíola.

#### 1.4.2 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é uma complexa sequência de eventos que se inicia com a absorção da partícula viral à superfície celular, com a subsequente fusão entre as membranas do vírus e da célula hospedeira (FIGURA 5) (McFADDEN, G., 2005)

Os poxvírus apresentam dois tipos de vírions, denominados vírus maduro intracelular (IMV) e o vírus envelopado extracelular (EEV), ambos podem iniciar o ciclo de multiplicação (BIDGOOD & MERCER, 2015). As diferenças entre o IMV e o EEV, encontram-se nas suas proteínas de superfície e ao número de membranas envoltórias e, portanto, acredita-se que eles possam se ligar a receptores distintos da célula hospedeira. Entretanto, apesar das diferenças na absorção, hoje sabe-se que somente a membrana da partícula IMV se funde com a membrana celular. As partículas EEV perdem seu envelope mais interno antes da penetração e, após essa perda, penetra na célula infectada através da fusão da membrana externa com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (MOSS, B., 2007).

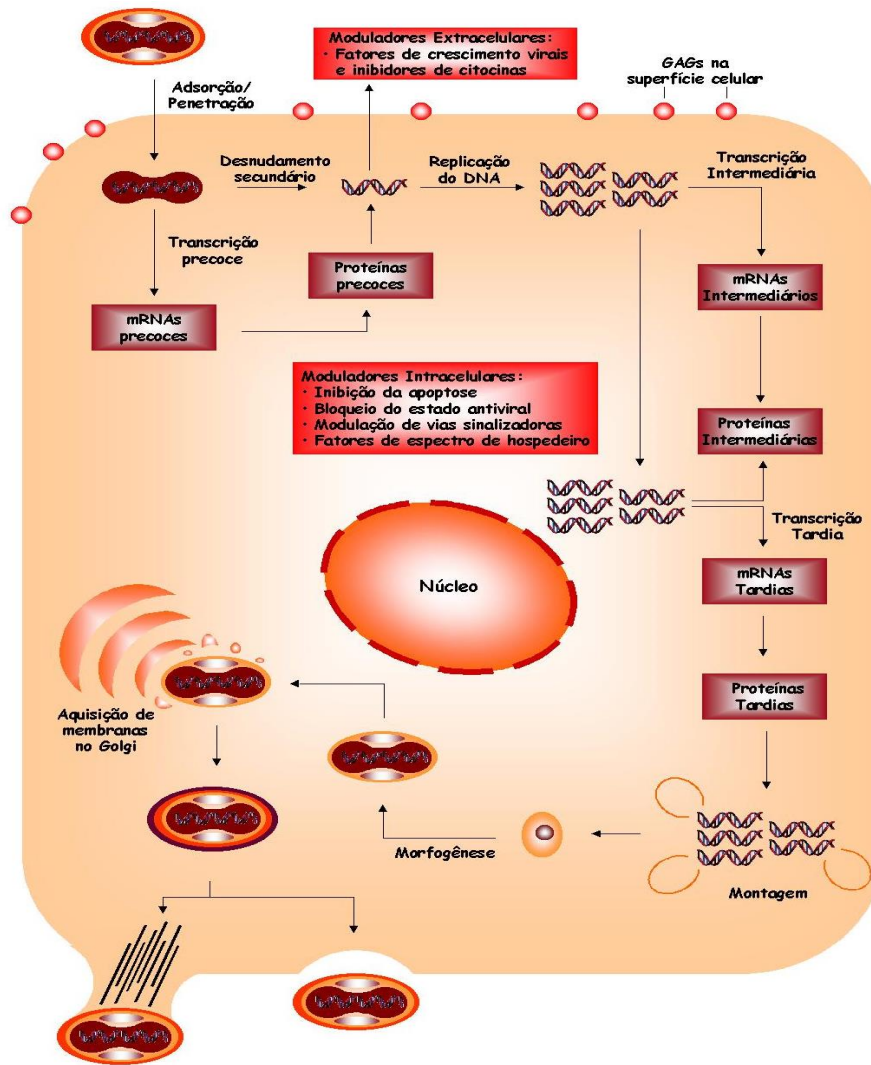
De maneira geral, ocorre a adsorção do vírus aos receptores da superfície celular e posteriormente a fusão entre as membranas do vírus e a célula hospedeira, liberando assim, o cerne viral no citoplasma (desnudamento primário). Adicionalmente, foi verificada a penetração dos poxvírus através do processo de macropinocitose, mediada por receptor seguida da fusão do



envelope viral com a membrana do endossomo formado (BIGOOD & MERCER, 2015).

Após o desnudamento primário os genes dos poxvírus são transcritos em três etapas temporais: precoce, intermediária e tardia. Na etapa precoce, a RNA polimerase viral e fatores de transcrição viral irão desencadear a expressão de genes precoces. Esta etapa é controlada pelos promotores virais. A tradução desses mRNAs produz proteínas que estão envolvidas na inibição da resposta antiviral do hospedeiro, na replicação e transcrição do DNA viral e na produção de fatores de transcrição dos genes intermediários. Em seguida, ocorre a desintegração do cerne (desnudamento secundário), liberando o DNA viral no citoplasma para que ele possa funcionar como molde para a etapa de replicação genômica. A transcrição dos genes intermediários é responsável pela produção de enzimas e fatores de transcrição dos genes tardios, que por sua vez, são responsáveis pela síntese de proteínas estruturais, fatores de transcrição precoces e enzimas que constituirão a partícula madura (McFADDEN, 2005)

Ainda segundo McFadden (2005), concomitantemente ao acúmulo de produtos gênicos tardios, ocorre o processo de morfogênese das novas partículas virais infecciosas. A morfogênese acontece em regiões específicas no citoplasma, que recebem o nome de fábricas virais. Inicialmente são formadas por partículas imaturas que, após uma série de processamentos proteolíticos, são transformadas em IMVs, possuindo apenas uma membrana externa, representando a maior parte da progênie infecciosa. A maioria dos IMVs são liberados durante a lise celular, desempenhando um importante papel na transmissão de um hospedeiro para outro. Alguns IMVs podem receber membranas adicionais durante a morfogênese, formando os vírus envelopados intracelulares (IEV). Os IEVs podem se associar aos microtúbulos, movimentando-se para a periferia celular, onde fundem sua membrana externa com a membrana plasmática, expondo o vírus envelopado associado à célula (CEV). O CEV pode ser transmitido para as células vizinhas pela polimerização da cauda de actina ou pela liberação como EEV e, por isso desempenha um papel importante na disseminação viral dentro do hospedeiro.



**FIGURA 5: Ciclo de multiplicação dos poxvírus.** O ciclo inicia com a adsorção viral na membrana plasmática. Em seguida, ocorre a fusão e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Em seguida, ocorre a transcrição de genes precoces e esses induzem o desnudamento secundário e a, conseqüente, replicação do DNA. Durante e após a replicação do DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Por fim, ocorre a morfogênese das partículas virais que permanecem dentro da célula, são liberadas para o meio extracelular ou permanecem associadas à célula. Fonte: McFADDEN, 2005.

### 1.4.3 Construção de MVAs recombinantes

O método mais utilizado para geração de MVA recombinantes é por meio da recombinação homóloga. Neste método, células susceptíveis são transfectadas com plasmídeos de transferência contendo o gene exógeno sob o controle de um promotor de VACV, um gene marcador selecionável ou um gene de resistência a antibióticos, e flancos correspondentes a regiões não essenciais do genoma do MVA. A transfecção do plasmídeo de transferência em células previamente infectadas pelo vírus MVA permite que a recombinação homóloga entre o plasmídeo e o genoma do vírus ocorra naturalmente em taxas relativamente altas (~ 0,1%). Os vírus recombinantes podem, em seguida, ser selecionados de diversas maneiras, dependendo do marcador de seleção utilizado (MOSS, 1996; MASTRANGELO *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005).

Com relação aos promotores de VACV, esses possuem aproximadamente 30 pb e podem ser do tipo precoce, intermediário ou tardio. Alguns plasmídeos combinam promotores fortes do tipo precoce e tardio, garantindo um sistema com níveis de expressão tanto na fase precoce quanto na tardia do ciclo de multiplicação (ROCHA *et al.*, 2004).

## **RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

## RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é considerado um dos principais patógenos de felinos domésticos e selvagens. Este retrovírus é responsável por infecções concomitantes ou isoladas, levando a inúmeros casos de óbito por ano, gerando uma preocupação tanto para as espécies felinas ameaçadas de extinção, quanto para espécies domésticas de valor inestimado para seus proprietários.

Em estudos epidemiológicos realizado no Estado de Minas Gerais, CAXITO e colaboradores (2003) (2006), identificaram, por meio de estudos filogenéticos, que somente o FIV subtipo B circula em Belo Horizonte, São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

Estes dados epidemiológicos demonstram, claramente, que este retrovírus circula no Brasil, e devido à gravidade das doenças provocadas por ele, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos que estabeleçam metodologias de tratamento, controle e prevenção eficazes em conter a disseminação deste vírus em nosso País.

O combate ao FIV é um grande desafio, pois desde sua descoberta em 1986, é possível observar que mesmo com grandes investimentos, o sucesso para o desenvolvimento da vacina para este patógeno tem sido limitado e, em alguns casos, o uso de vacinas experimentais tornaram os indivíduos mais susceptíveis à infecção (RICHARDSON, et al., 2002; HUISMAN et al., 2008B).

Até o momento a vacina experimental mais bem sucedida contra o FIV é a vacina Fel-O-Vax®, desenvolvida contra FIV subtipo A e D. Entretanto ainda não existe uma vacina contra o FIV subtipo B, que é o prevalente no Brasil (HUISMAN, et al., 2008A).

Desenvolver uma vacina contra FIV terá implicações que irão além da medicina veterinária, pois o FIV pode produzir sinais clínicos semelhantes aos sintomas observados em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Desta

forma o FIV é um modelo promissor para estudos profiláticos e terapêuticos para o HIV (SAMMAN et al., 2010).

Com o passar do tempo, novas tecnologias vacinais vêm sendo desenvolvidas para suprir a demanda por vacinas contra enfermidades para as quais ainda não existe um imunógeno eficiente. Entre estas destacam-se os vetores virais recombinantes, exemplificados pelo vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA), que tem a capacidade de acomodar em seu genoma até 25 Kb de DNA exógeno. A utilização de vetores virais recombinantes, como o MVA, pode reduzir a falha na apresentação de epítomos, o que pode ocorrer durante a utilização de métodos vacinais clássicos.

De fato, o sucesso do emprego desta ferramenta pode ser atestado pelo volume de trabalhos relacionados, atualmente disponíveis na literatura. Entre as vantagens apresentadas pelo vetor vacinal baseado no MVA destacam-se: baixo custo de produção; estabilidade ao calor; resistência ao congelamento e dessecação; simplicidade de administração, segurança ao vacinado, inclusive em indivíduos imunossuprimidos e, principalmente, geração de imunidade de longa duração.

Levando-se em consideração: **i)** a alta incidência de FIV no Brasil e no mundo; **ii)** a gravidade das doenças provocadas por este Retrovírus; **iii)** a ineficiência das vacinas comercialmente disponíveis, ou sua simples inexistência (no caso do subtipo B); **iv)** o potencial desta retrovirose como modelo de doenças humanas altamente impactantes; e **v)** com a expertise conjunta no estudo de retrovírus felinos e no desenvolvimento de vetores MVA recombinantes com fins vacinais, foi desenvolvido um vetor vacinal recombinante baseado no vírus MVA, expressando epítomos imunogênicos do FIV. Assim, a imunogenicidade deste imunógeno foi avaliada em modelo murino como um primeiro passo rumo ao seu possível uso como vacina comercial.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

### **1. Objetivo Geral**

Avaliar, em modelo murino, a imunogenicidade de um vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) expressando epítomos imunogênicos do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)

### **2. Objetivos Específicos**

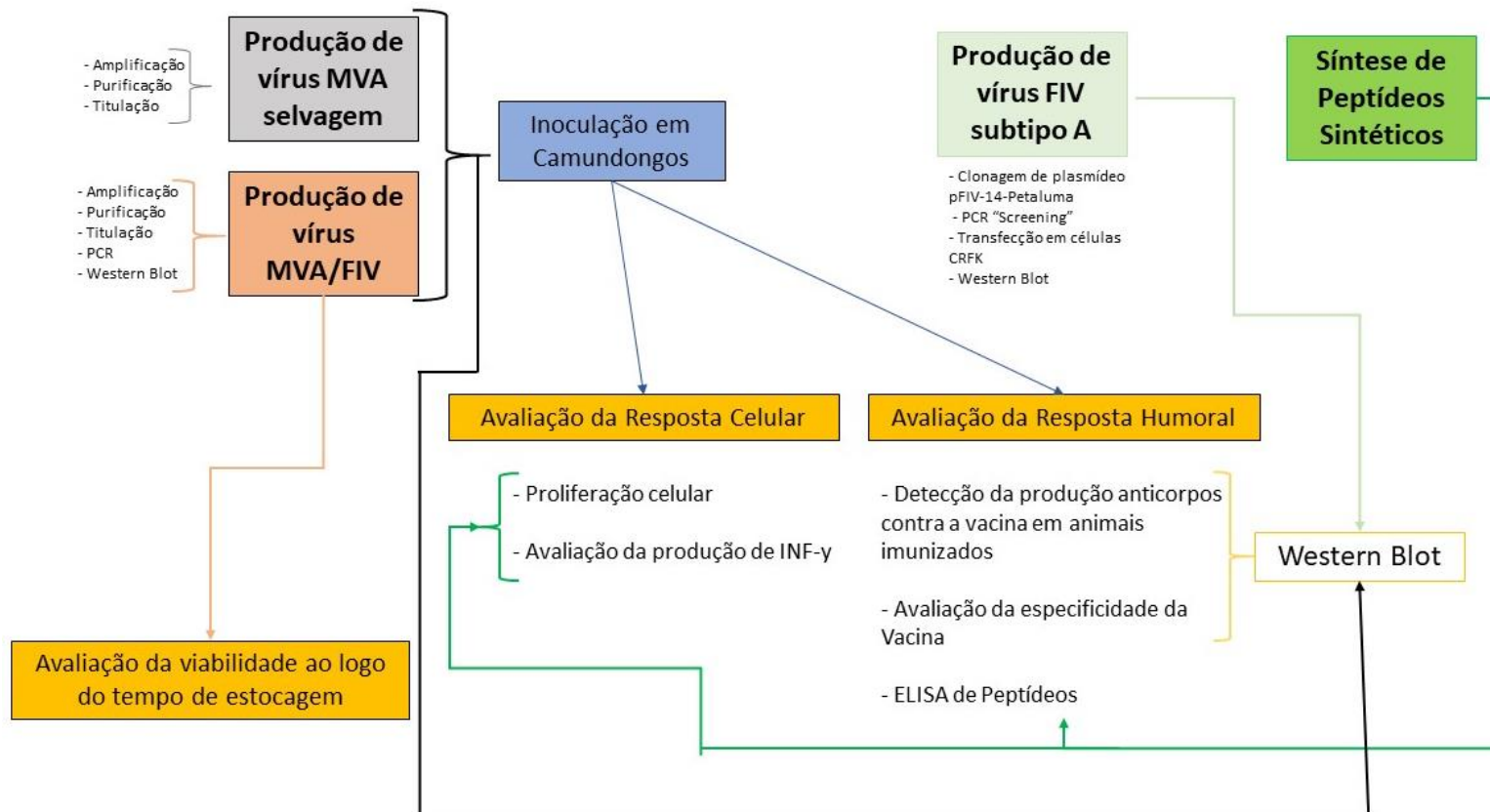
- 1) Gerar um vírus MVA recombinante contendo a sequência codificadora de um polipeptídeo imunogênico do FIV-B em seu genoma (MVA/FIV);
- 2) Detectar a expressão das proteínas do envelope recombinantes do vírus MVA/FIV através de ensaios de Western Blot;
- 3) Avaliar e selecionar por análise *in silico*, epítomos imunogênicos correspondentes à região V1-V3 do gene *env* do FIV subtipo B;
- 4) Avaliar a resposta imune humoral e celular, contra a vacina experimental, em modelo murino;
- 5) Avaliar a viabilidade ao longo de 3 meses de estocagem (“*shelf-life*”) da ferramenta vacinal liofilizada e refrigerada;



## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. Estratégia de Trabalho

A Figura 06 apresenta o esquema simplificado do fluxo de trabalho desenvolvido nesta Tese.



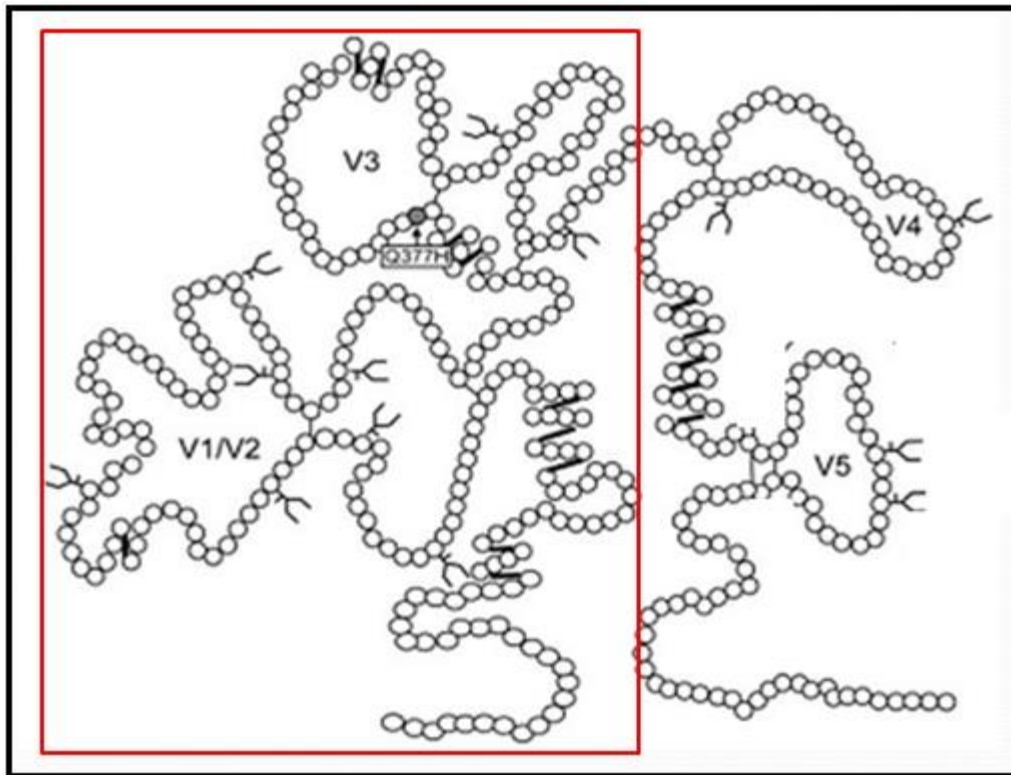
**FIGURA 06: Fluxo de trabalho simplificado**

## 2. Amostras de Vírus

O Vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) selvagem foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health, NIH, EUA), na passagem número 581. Desde então, esse MVA é rotineiramente multiplicado e titulado em células de fibroblasto de embrião de Galinha (CEF) e em células de rim de hamster (BHK-21) no Laboratório de Virologia Baásica e Aplicada (LVBA).

Em trabalho prévio (ANDRADE, 2012), após a recombinação homóloga entre o vetor pLW44/FIV e o vírus MVA selvagem, foi dado o início a etapa seleção de vírus recombinantes, a qual culminou na seleção de 3 clones provenientes do mesmo experimento de recombinação (MVA/FIV<sup>c1</sup>, MVA/FIV<sup>c2</sup> e MVA/FIV<sup>c3</sup>). A construção MVA/FIV inseriu no genoma do MVA selvagem o gene para a expressão da proteína verde fluorescente e o gene para a expressão da região V1, V2 e V3 da proteína do envelope do FIV (FIGURA 7), fusionado com uma sequência codificadora para o peptídeo marcador FLAG na porção C terminal. Porém, somente o MVA/FIV<sup>c1</sup> foi amplificado, purificado e verificada a produção da proteína FIV/ENV<sup>P</sup> por Western Blot.

Para a realização desse projeto de doutorado, foram amplificados, purificados, titulados e sequenciados os vírus MVA/FIV<sup>c2</sup> e MVA/FIV<sup>c3</sup>, além de verificada a produção da proteína FIV/ENV<sup>P</sup> pelos vírus recombinantes, por Western Blot, em células infectadas. O objetivo foi comparar os três vírus recombinantes entre si e escolher o vírus apresentasse maior título e melhor produção proteica comprovada empiricamente através de Western Blot.



**FIGURA 7: Representação das regiões variáveis do envelope do FIV.** O quadrado vermelho representa as regiões V1, V2 e V3 que foram inseridas no genoma do vetor MVA para produção da vacina recombinante. (Adaptado de SAMMAN *et al.*, 2010).

## 2.1 Obtenção dos vírus MVA/FIV<sup>C2</sup>, MVA/FIV<sup>C3</sup> e MVA selvagem

### 2.1.1 Cultivo de células

Para a amplificação foi utilizada a linhagem contínua de células fibroblásticas de rim de filhote de Hamster (BHK-21). Para o cultivo destas células foi utilizada uma adaptação do protocolo de cultura de Células BHK-21 (STOKER & MACPHERSON, 1962), que consiste em crescer as células em meio de cultura DMEM (GIBCO™) contendo 7% de soro fetal bovino (SFB)

(CULTILAB) acrescido dos antibióticos penicilina e estreptomicina (5000U/5mg) em temperatura de 37°C, em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

### 2.1.2 Multiplicação viral

Os vírus MVA selvagem, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> foram multiplicados em monocamadas de BHK-21 aderidas a garrafas de 150 cm<sup>2</sup>. Tais células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 1, sendo a adsorção em um volume final de 5 mL de meio MEM incompleto, a 37°C e com homogeneização constante durante 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi lavada com PBS 1X e acrescentado 25 mL de MEM completo com 2,5% de SFB. A garrafa foi novamente incubada a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% por cerca de 48 horas.

Após essas 48 horas, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone, e a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 2.500 RPM (IEC Centra MP4R Rotor 804). O sedimento foi armazenado a -70°C até o momento da utilização.

### 2.1.3 Amplificação Viral

Os vírus recombinantes selecionados MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> e o vírus MVA selvagem foram, inicialmente, amplificados por meio de passagens subsequentes em placas de 12 e 6 cavidades e em garrafas de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup>, de modo a se obter um título viral mais elevado em relação à passagem anterior. Essas amplificações foram feitas da mesma forma descrita no item 2.1.2, com modificações apenas no que se refere ao volume final de adsorção e ao volume de meio DMEM 2,5% SFB acrescentado ao final da adsorção.

#### 2.1.4 Purificação viral

Para a purificação viral, cerca de 20 garrafas de 150 cm<sup>2</sup> foram infectadas com cada vírus de acordo com o procedimento descrito no item 2.21. Os sedimentos obtidos foram, então, suspensos em 8 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0, homogeneizados e centrifugados a 2.500 RPM por 15 minutos a 4°C (IEC Centra MP4R Rotor 804). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em banho de gelo. Os sedimentos, por sua vez, foram suspensos em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl), colocados em gelo e neles mantidos por 10 minutos. Após esse período, os sedimentos foram homogeneizados em Douncer por aproximadamente 50 manipulações e, então, centrifugados a 2.500 RPM por 15 minutos a 4°C (IEC Centra MP4R Rotor 804). Os sobrenadantes foram coletados, adicionados ao anterior e suspensos em 8 mL de tampão de lise. Ao juntar todos os sobrenadantes, um total de 26 mL de suspensão viral foi obtido. Essas suspensões virais foram, então, centrifugadas em colchão de sacarose a 36%, a 14.000 RPM por 2 horas a 4°C (ultracentrífuga Sorvall OTD-Combi rotor AH629). Após esse período, os sobrenadantes e as sacaroses foram desprezados, os sedimentos, contendo as partículas virais, foram suspendidos em 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e armazenados a -70°C para posterior titulação e uso.

#### 2.1.5 Titulação viral

As suspensões virais foram, inicialmente, submetidas à sonicação em três ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Foram feitas diluições seriadas dessas suspensões em meio MEM incompleto, sendo utilizados 500µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BHK-21 em uma placa de seis cavidades. Uma cavidade da placa foi reservada para controle de célula, sendo acrescentados 500 µL de MEM incompleto. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Em seguida, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e foram acrescentados 2 mL de MEM

contendo SFB a 2,5% em cada cavidade. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. O título foi expresso pelo número médio de “placas” apresentando fluorescência verde, observadas nas cavidades da placa cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 “placas”, multiplicado pelo inverso da diluição por mL.

## 2.2 Análises dos vírus MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup>

### 2.2.1 Análise genética dos MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup>

#### 2.2.1.1 Obtenção de ácidos nucleicos

Para confirmar a inserção correta do gene que codifica a região V1-V3 do envelope do FIV no genoma dos vírus recombinantes, monocamadas de BHK-21 em placas de seis cavidades foram infectadas com 500 µL dos vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> em uma m.o.i. de 1. Uma cavidade da placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentados 500 µL de meio DMEM. A infecção foi feita como o item 2.1.2.

As extrações de DNA e RNA foram realizadas adicionando 1 mL de tri-reagente para 500µL de amostra em uma concentração de até 10<sup>6</sup> células. Esta solução foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Ao término deste tempo, foram adicionados 200µL de clorofórmio e homogeneizada por 15 segundos. Após esta etapa, as amostras foram incubadas a 25°C por dois minutos e logo centrifugadas (Jouan, modelo BR4i) a 12226 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foram observadas três fases: fase orgânica inferior (vermelha) contendo as proteínas, a interfase (branca) contendo o DNA e a fase aquosa inferior contendo o RNA.

Para isolar o RNA a fase aquosa foi transferida para microtubo de 1,5mL e foi adicionado 500µL de isopropanol para cada 1 mL de tri-reagente. Esta solução foi então incubada a 25°C por 10 minutos. Ao término do tempo de

incubação, foi centrifugada a 12000G por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e o pellet de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% para cada mL de Tri-reagente. A amostra foi posta sob agitação vigorosa em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP56) e logo foi centrifugada a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o microtubo foi deixado secar brevemente. Após a secagem, o RNA foi ressuspensão em 20µL de H<sub>2</sub>O e foi adicionado 0,93µL de RNAsin por amostra para evitar a degradação do RNA. Após a adição do RNAsin o amostra foi incubada a 60°C por 10 minutos e estocada a uma temperatura de -80°C.

Para o isolamento do DNA após a remoção da fase aquosa contendo o RNA, foi adicionado ao microtubo contendo DNA e proteínas, 300µL de etanol 100% (MERK) e foi misturado por inversão. Após a mistura foi incubado a 25°C por 3 minutos. Ao término do tempo foi centrifugado a 1990 x g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C. Ao fim da centrifugação, foi removida a fase etanol-fenol (contendo as proteínas) por inversão. O DNA foi lavado duas vezes com 1 mL de solução citrato-tri-sódico 10% etanol. Entre cada lavagem foi incubado por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos e ao termino de cada lavagem foi centrifugado a 1990 x g por 5 minutos a 4°C. Após as lavagens o sedimento foi ressuspensão com 1,5 mL de etanol 75% e incubado por 20 minutos a 25°C homogeneizando a cada cinco minutos. Ao termino do tempo foi centrifugado a 4600 RPM a 4°C por 5 minutos. Terminando a centrifugação foi retirado o etanol por inversão foi deixado secar o microtubo por 10 minutos. Após a secagem, foi adicionado 150µL de NaOH 8mM e 260µL de TE 1X e 2X o volume de isopropanol. Este produto foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 11400 RMP por 10 minutos a 25°C. Ao termino da centrifugação foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensão e, 20µL de H<sub>2</sub>O e armazenado em congelador a uma temperatura de -20°C.

O RNA e o DNA obtidos foram quantificados por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

O RNA foi convertido em cDNA por meio da técnica de Transcriptase Reversa PCR (RT-PCR). Para esta técnica foi utilizado o kit RT-PCR



(Promega®). A RT-PCR foi feita em termociclador Vapo.protect (Eppendorf-Alemanha), na qual foram utilizados 3,5µL de H<sub>2</sub>O, 4µL de MgCl<sub>2</sub>, 2µL de tampão 10X, 2µL de dNTP, 0,5µL de RNAsin, 1µL da enzima transcriptase reversa (RT), 1µL do iniciador FIV-PstIR (TABELA 1) e 6µL de RNA molde. Sendo que o iniciador e RNA molde foram aquecidos separadamente a 70°C por cinco minutos e logo incubados em gelo por 5 minutos, antes de serem mesclados com os outros componentes do mix.

As condições do ciclo de amplificação da RT-PCR foram constituídas por uma adaptação do ciclo a 25°C por 15 minutos, 42°C por 60 minutos, 70°C por 15 minutos (RIO., *et al.*, 2011) .

Tanto o DNA quanto o cDNA foram utilizados como moldes. Na PCR, foram utilizados 1 µl do DNA molde; 0,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2 µL de tampão 10X (500 mM KCl , Triton X100 a 1%, 100 mM Tris pH 8,3); 0,2 µL de enzima Taq polimerase Platinum® (Invitrogen-USA) (3 U/µL); 1 µL de iniciador senso (FIV-SmaIF) (10 µM); 1 µL de iniciador anti-senso (FIV-SmaIF) (10 µM) (TABELA 1); 0,4 µL de dNTPs (10 mM) e H<sub>2</sub>O até o volume final de 20 µL.

As condições do ciclo de amplificação utilizado foram constituídas por 5 ciclos à 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, 1 ciclo a 72°C por 5 minutos, 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 45°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos e finalmente 1 ciclo a 72°C por 10 minutos.

Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 1% em TBE 1X, acrescido de 1,2 µL de Brometo de Etídio (10mg/mL) a um potencial elétrico constante de 80 V. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta (MultiDoc-IT Digital Imaging System-UVP) e fotografados.

**TABELA 1: Iniciadores utilizados para amplificar a sequência ENV/v1-v3**

Iniciadores	Sequência	Amplificado
FIV-SmaIF	5'- CCTCCCGGGATGTTTAGGGTACCAGGCATTAC GTCAC-3'	1389pb
FIV-PstIR	5'- GGCTGCAGTTACTATTTGTCATCATCATCTTTA TAAT CTACCGGTTTGGCTCCTGTGAC-3'	

#### 2.2.1.2 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico foi realizado em sequenciador automático capilar Mega Base 1000 (GE HEALTHCARE), através do método de dideoxi (SANGER *et al.*, 1977). Foi utilizado o Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBase), obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Após a Extração de DNA, uma PCR foi realizada para amplificar as sequências correspondentes às regiões V1-V3 do envelope do FIV inseridas nos vírus recombinantes. Este amplificado foi purificado pelo kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up System (Promega) e cerca de 100ng de cada Amplificado e 5pmol de iniciadores senso ou anti-senso foram utilizados em cada reação de sequenciamento. Essa reação foi feita em placa de 96 poços, em termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler® Eppgradient nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 segundos, seguida de 36 ciclos de 25 segundos a 95°C por 15 segundos a 50°C e 3 minutos a 60°C. As reações foram submetidas à precipitação com acetato de amônio e lavadas com etanol de acordo com as instruções do kit DYEnamic™ ET Dye terminator, para a

eliminação dos dideoxynucleotídeos marcados não incorporados e, finalmente, o DNA foi homogeneizado em tampão de amostra

A análise dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento nucleotídico foi feita com o auxílio da plataforma “*Electropherogram quality analysis*” – (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. As sequências consenso dos vírus recombinantes geradas foram comparadas com a sequência do plasmídeo pGEMT/FIV, usado na construção do plasmídeo pLW44/FIV.

As sequências inferidas de nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos pela plataforma “*Expasy translate*” – (<http://web.expasy.org/translate/>) da empresa “*Expasy Bioinformatics Recurse Portal*”. Para verificar a presença de códons de terminação em posições errôneas, verificando também se houve alteração na janela de leitura. Após esta análise, a sequência de aminoácidos foi comparada por alinhamento com a sequência do plasmídeo pGEMT/FIV construído no meu projeto de mestrado e utilizado como base para a construção de todos os vírus MVA/FIV recombinantes. Este por sua vez foi previamente comparado com outras sequências de aminoácidos de proteína de envelope de FIV subtipo B depositadas no banco de dados “*GenBank*”, utilizando a plataforma “*Multalin*” (*Multiple sequence alignment by Florence Corpet* – <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (CORPET, 1988).

### 2.2.2 Detecção da Proteína FIV/ENV<sup>P</sup> por Western Blot

Para a realização do Western Blot, monocamadas de BHK-21 em placa de seis cavidades foram infectadas com o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> como descrito anteriormente no item 2.1.2. Após 48 horas cada monocamada foi raspada com êmbolo de seringa de 1mL, estéril, e coletada em tubo de 15mL. As células foram centrifugadas por cinco minutos à 115 x g a 4°C (centrifuga Jouan modelo BR4i) O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas e ressuspensas com PBS a 4°C. Após este processo as células

foram centrifugadas novamente a 115 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 50mM NaF, 10mM  $\beta$ -glicerolfosfato  $C_3H_9O_6P$ , 100mM EDTA, 10% Glicerol, 1% Triton X-100) acrescido de proteases (1mM PMSF, 1mM Naova/Soium orthovanadate, Pepstatina, Aprotinina, Leupeptina). Esta suspensão foi transferida para microtubo e centrifugada a 130 x g a 4°C por dez minutos. Depois da centrifugação, foi coletado o sobrenadante contendo o extrato proteico.

Os extratos proteicos foram, desnaturados por aquecimento a 100°C por 5 minutos e, juntamente com um marcador de massa molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers – Promega), submetidos a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). A corrida eletroforética foi realizada a um potencial elétrico constante de 60 V até que as amostras saíssem do gel de empilhamento e depois a 100 V.

Após o fracionamento, as amostras foram transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Armesham Hybond<sup>TM</sup>-P) por 2 horas a um potencial elétrico constante de 350mA. Em seguida, foi feito o bloqueio, deixando a membrana por 1 hora à temperatura ambiente em tampão de bloqueio 2,5% [2,5% (p/v) de leite desnatado em pó (Molico) em TTBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,1%)]. As membranas foram lavadas com tampão de bloqueio 0,5% por três vezes, 10 minutos cada. A reação com os anticorpos monoclonais contra Flag (Anti-Flag – SIGMA-ALDRICH, EUA ) foi feita *overnight* a 4°C e usados na concentração 1,5:3000, respectivamente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas com tampão de bloqueio 0,5% por três vezes, 10 minutos cada. A reação com os anticorpos secundários (anticorpos policlonais anti-mouse IgG HRP) ocorreu durante 2 horas à temperatura ambiente, em uma concentração 1:10.000 ou 1:3.000, e foram realizadas 3 lavagens com tampão de bloqueio 0,5%. Por último, as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL<sup>TM</sup> Plus *Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) e o filme Armesham Hyperfilm ECL (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

### **3. Avaliação da viabilidade ao longo do tempo de estocagem (*shelf-life*) do Vírus MVA/FIV**

As alíquotas de vírus MVA/FIV armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ , purificadas e tituladas, foram submetidas à liofilização. Esta técnica baseia-se na remoção da água do material biológico congelado, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo (MORGAN *et al.*, 2006). Uma vez liofilizadas as pastilhas foram acondicionadas em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para testar a viabilidade biológica do produto vacinal, o vírus foi titulado em três etapas para fins de comparação. A primeira consiste na titulação do vírus estocado na coleção de vírus e material biológico do Laboratório de virologia Básica e Aplicada (LVBA) acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A segunda etapa consistiu na titulação do vírus logo após o processo de liofilização e a última etapa foi a titulação do vírus liofilizado após 3 meses de estocagem em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ . As titulações foram realizadas através da infecção de células BHK-21 com o vírus vacinal. No caso dos liofilizados, eles foram reconstituídos no mesmo volume de Tris-HCl 10mM a partir do qual foram liofilizados. Estes vírus foram então utilizados para infectar as monocamadas em placas de seis poços com o inoculo vacinal preparado em microtubos de 1,5mL numerados de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$ . No primeiro tubo foram adicionados 999 $\mu\text{L}$  de Meio DMEM incompleto e 1 $\mu\text{L}$  da amostra testada. Nos outros microtubos foram adicionados 900 $\mu\text{L}$  de meio DMEM incompleto e 100 $\mu\text{L}$  da diluição anterior, sendo os 100 $\mu\text{L}$  do último microtubo descartados. Entre cada diluição as amostras foram homogeneizadas em agitador.

O experimento foi realizado em duplicata e em cada poço foram inoculados 450  $\mu\text{l}$  de cada diluição, iniciando pela diluição  $10^{-4}$ . As placas ficaram em adsorção por 1 hora, com leve agitação a cada 15 minutos. Após a adsorção foram acrescentados 2,0 mL de meio DMEM 2,5% em cada poço.

As placas foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. Após as 48 horas as placas foram analisadas por imunomarcagem utilizando anticorpos anti-WR.

### 3.1 Imunomarcção

Para realizar a imunomarcção, foi removido o meio de cultura das placas e foi adicionado aos poços, 500µL de solução fixadora (1:1 metanol/acetona). Após a fixação, o agente fixador foi removido e as placas foram lavadas três vezes com água destilada. Ao término das lavagens foram adicionados aos poços 500µL do anticorpo Anti-WR diluído em PBS 3% soro fetal bovino (na concentração de 1:1000) e o sistema foi incubado por 1 hora.

Ao término da incubação, a placa foi lavada 3 vezes e, tratada com proteína A conjugada com peroxidase diluída em PBS 3% SFB (concentração de 1:10000) e incubada por uma 1 hora. Ao término, as placas foram lavadas três vezes e, em seguida, foram adicionados 500µL da solução reveladora (10µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 10mL PBS 1X contendo Dianisidina suspensa em etanol 100%). Em seguida, as placas foram incubadas por 10 minutos ou, até que pontos marrons, correspondendo às placas de infecção aparecessem. Em seguida as placas foram lavadas três vezes e foi realizada a contagem das placas de infecção para quantificação do título viral.

## 4. Predição de peptídeos sintéticos *in silico*

A predição de epítomos CD8<sup>+</sup> para o envelope de FIV e para a região V1-V3 do envelope de FIV foi realizada utilizando os programas de predição BIMAS ([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) e IEDB ([http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\\_binding.html](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html))

Esta análise identificou a existência de epítomos T-específicos para os alelos das moléculas de MHC classe I H2-Kb e H2-Db.

Os peptídeos sintéticos foram adquiridos da empresa GenOne – BRASIL. Inicialmente foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 10mg/mL e armazenados a -80°C. Antes da utilização, os peptídeos foram diluídos para a concentração desejada em meio Eagle modificado por

Dulbecco (DMEM GIBCO™, EUA) incompleto, sem adição de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 2mM de L-glutamina.

## 5. Imunização em camundongos

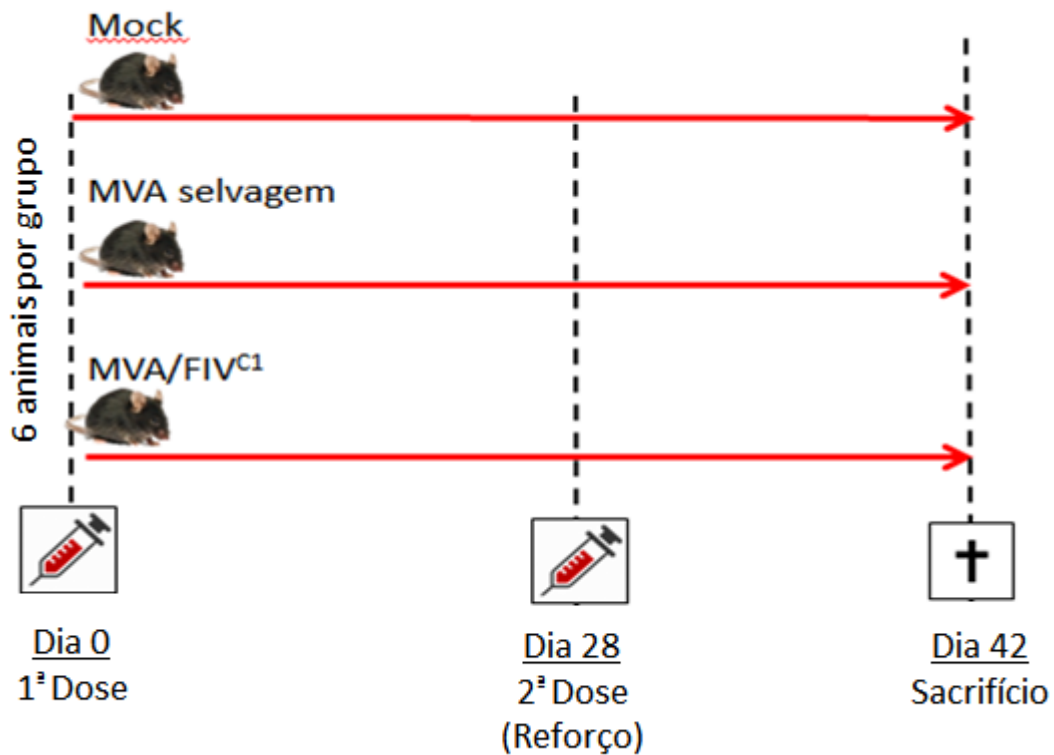
### 5.1 Os Camundongos

Os camundongos machos da linhagem C57/BL utilizados neste estudo foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG em ambiente climatizado (temperatura  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (ciclo de 12h de claro e 12h de escuro), alimentados com ração padrão para camundongos e água *ad libitum*. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, protocolo 355/2013.

### 5.2 O protocolo vacinal

Os vírus foram diluídos em Tris-HCl 10mM estéril. Os animais foram imunizados por inoculações intramusculares, na parte posterior das coxas em um volume final de 40 $\mu\text{L}$  por coxa.

Para este experimento, camundongos com idade superior a 7 semanas foram divididos em três grupos contendo 6 animais em cada grupo. O primeiro grupo foi inoculado com Tris-HCl 10mM estéril, o segundo foi imunizado com  $10^6$  do vírus MVA selvagem e o terceiro grupo foi imunizado com o  $10^6$  do vírus MVA/FIV. Após 28 dias, todos os grupos receberam uma dose de reforço. 14 dias após a inoculação os animais foram eutanasiados e foi colhido o baço e o sangue. O soro foi separado do sangue total através da centrifugação durante 10 minutos a 600 x g. O soro coletado foi armazenado em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização em ensaios posteriores (FIGURA 08).



**FIGURA 08: Esquema de inoculação dos grupos Mock, MVA selvagem e MVA/FIV.** Imagem representa o protocolo de vacinação, consistindo na estratégia de dose/reforço. Foram trabalhados 3 grupos vacinais, *Mock* consistindo em animais inoculados com Tris-HCl, Grupo inoculado com MVA Selvagem, e o grupo inoculado com MVA/FIV<sup>C1</sup> em todos os grupos foi utilizado n=6.

## 6. Avaliação *in vitro* da produção de Interferon $\gamma$

Para confirmar a imunogenicidade dos epítomos preditos *in silico* foi realizada uma avaliação *in vitro* utilizando os peptídeos sintéticos para FIV descritos posteriormente (TABELA 2). Para este fim, foi realizado um ensaio de marcação de citocinas intracitoplasmáticas, no qual foi determinado o número de



células T CD8<sup>+</sup> no baço de camundongos imunizados com o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> que respondem à estimulação com um dos peptídeos descritos. Após a re-estimulação com cada peptídeo foi avaliada a produção de INF- $\gamma$  destas células.

**TABELA 2: Peptídeos FIV sintéticos que foram utilizados no trabalho**

	<b>Nome</b>	<b>Sequência</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Alelo</b>
01	FIV <sup>371-384</sup>	IALQCNSTKNLTFA	14	Db
02	FIV <sup>275-286</sup>	LSYCTDPLQIPL	12	Kb
03	FIV <sup>58-67</sup>	SMVYLLIGYL	10	Db
04	FIV <sup>287-298</sup>	INNYTFGPNQTCM	12	Kb
05	FIV <sup>59-70</sup>	MVYLLIGYLRYL	12	Kb
06	FIV <sup>134-141</sup>	VVWRLPPL	08	Kb/Db
07	FIV <sup>289-298</sup>	YTFGPNQTCM	10	Kb/Db
08	FIV <sup>55-64</sup>	NVLSMVYLLI	10	Kb/Db

### 6.1 Análise de citocinas intracitoplasmáticas através de citometria de fluxo

Após a eutanásia por deslocamento cervical, os baços foram obtidos, macerados com lâmina fosca em 10 mL de PBS 1x e o extrato centrifugado por 5 minutos a 1500 RPM. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e os esplenócitos foram ressuspensos em 5 mL de tampão ACK (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> 1M, EDTA 0,1M) e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 25 mL de PBS 1X para neutralizar o tampão de lise e em seguida, centrifugado por 5 minutos a 1500 RPM. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os esplenócitos foram

ressuspensos em 3 mL de meio DMEM 10% SFB para contagem celular em câmara de Newbouer. O número de células viáveis foi ajustado a uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  por mL.

Em seguida, foi distribuído 100µL em cada poço em placa de 96 poços e em seguida foram adicionados 100µL do peptídeo a ser avaliado em uma diluição de  $10^{-5}$ . Após, a placa foi incubada na estufa (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Ao término da incubação, foi adicionado em cada poço, 20µL de Brefeldina A (50µg/mL) e a placa foi incubada em estufa (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Após esta etapa, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1500 RPM a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em 50µL de solução contendo anticorpos Anti-CD8 (BD Pharmingen - Franklin Lakes, USA) (concentração de 1:200) em PBS 2%SFB, em seguida a placa foi incubada no gelo por 30 minutos e ao término da incubação, centrifugada por 3 minutos a 2100 RPM a 4°C, em seguida, o sobrenadante foi desprezado. Após esta etapa, as células foram ressuspensas em 150µL de PBS 1X e centrifugadas por 3 minutos a 2100 RPM a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a placa foi agitada em vortex. Em seguida, foi adicionado 150µL de Paraformaldeído 1% em PBS 1X. Após esta etapa, a placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao término da incubação a placa foi submetida a três ciclos de lavagem consistindo de centrifugação por 3 minutos a 2100 RPM a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Ao término das lavagens, foi adicionado 50µL de anticorpo Anti-IFN (BD Pharmingen - Franklin Lakes, USA) (concentração de 1:100) em PBS 1X 2% SFB com 0,25% Saponina e incubado *overnight* em geladeira a 4°C. Após esta etapa, a placa sofreu 3 ciclos de lavagens como as descritas acima. Ao término das lavagens, as células foram ressuspensas em 200µL de PBS 1X 2% SFB e avaliadas no citômetro de fluxo.

## 6.2 Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo

A análise das amostras foi realizada no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA) acoplado a um computador com o software Cell Quest (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA). A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células através do padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (*Forward Scatter x Side Scatter*), foram delimitadas as populações de linfócitos e/ou monócitos e a partir dessas foram avaliados 100.000 eventos para determinação dos padrões de fluorescência de cada amostra. Análises posteriores foram feitas utilizando o software Flow Jo (Tree Star) a fim de se determinar as populações positivas e negativas para cada marcação e quantificar a proliferação celular. A expressão média de moléculas constitutivas foi calculada através da intensidade média de fluorescência (MFI) do canal correspondente.

## 6.3 Ensaio de proliferação celular

Após a eutanásia dos animais, os baços foram removidos e armazenados em 3mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em tubos cônicos de 15mL em gelo. Em seguida os baços foram macerados com o auxílio de lâminas com borda fosca (Global Trade, Brasil) e o extrato foi centrifugado a 330 x g durante 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, as células foram incubadas por 5 minutos no gelo com tampão de lise ACK (0,15M NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub> 1M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1M) para remoção das hemácias. Ao término do processo de lise, o material foi novamente centrifugado a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com meio RPMI e, após centrifugação, suspenso em 1mL de meio com 10% de SFB. O número de células viáveis nessa suspensão foi estimado pela contagem de alíquotas misturadas com o corante azul de tripan (0,2%) em câmara de Neubauer.

O número de células viáveis foi então ajustado para  $1 \times 10^7$  células/mL. As células ajustadas foram diluídas em PBS 1x para posterior marcação com o corante carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) de acordo com o fabricante. As células marcadas foram distribuídas em duplicatas ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) em placas de 96 poços de fundo chato (NUNC, EUA) e incubadas por 5 dias em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  fracionadas nos grupos: estímulo (Peptídeo 3 -SMVYLLIGYL) a uma diluição de  $10^{-5}$ , RPMI (controle negativo) ou PMA (500ng/mL) e ionomicina (50ng/mL) (controle positivo).

### 6.3.1 Marcação das células com CFSE

Antes de serem semeadas nas placas de cultura, as células foram marcadas com o corante CFSE (CFSE Cell Proliferation Kit – C34554 – Invitrogen, Molecular Probes) diluído em DMSO, conforme instruções do fabricante e alíquotado a  $-70^\circ\text{C}$  e protegido da luz. No momento de uso,  $1,5 \mu\text{L}$  dessa alíquota foram diluídos para cada 1 mL de PBS 1x estéril. Como descrito anteriormente, as células, na concentração adequada, foram suspensas em meio de cultura estéril e uma alíquota de 1 mL ( $1,0 \times 10^7$  células) foi transferida para tubo cônico de 15 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de CFSE e, após a agitação para homogeneização os tubos foram mantidos por 10 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após incubação foram adicionados 2 mL de meio RPMI acrescido de 10% de SFB para bloquear a reação. Os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as células já marcadas com CFSE foram centrifugadas a  $300 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células, após passarem por duas lavagens em meio RPMI, foram ajustadas para  $1 \times 10^7$  células/mL (Quah, B. J., H. S. Warren, et al., 2007).

## 7. Produção do vírus FIV Petaluma

### 7.1 Produção do vírus FIV Petaluma

O vetor pFIV-14-Petaluma expressa em células imortalizadas fibroblásticas de rim de gatos (CRFK) ou em células primárias felinas, o FIV subtipo A (Petaluma).

Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Renato S. Aguiar (UFRJ, Rio de Janeiro). O pFIV-14-Petaluma possui como esqueleto estrutural o plasmídeo pTZ18R. Contendo um inserto de 9474pb que corresponde ao genoma proviral inteiro do FIV-14 proveniente de células CRFK infectadas, por este motivo encontra-se flanqueado por 8Kb de DNA celular (GENEBANK: m25381).

O vetor foi utilizado para transformar bactérias quimiocompetentes *E. coli* XL-10 GOLD (como descrito pelo fabricante). A triagem das bactérias positivas para o plasmídeo foi realizada por meio de PCR e digestão enzimática, como descrito posteriormente.

Para a verificação da presença do genoma viral no plasmídeo pFIV—14-Petaluma por PCR, foram utilizados oligonucleotídeos capazes de amplificar uma sequência conservada do gene *gag* presente em qualquer subtipo de FIV. Para isto, foi utilizado 1µL da cultura bacteriana crescida em caldo LB como molde de DNA. Para esta reação de PCR, foram utilizados os iniciadores, LVC-98 e LVC-99 descritos por CAXITO *et al.*, 2006) (TABELA 3). O amplificado esperado apresentou um tamanho de 733 pb e foi visualizado após o fracionamento eletroforético em gel de agarose sob luz ultravioleta.

**TABELA 3: Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do p17-p24 do gene *gag* do FIV**

Iniciadores	Sequência	Amplificado
LVC-98	5'-AATATGACTGTATCTACTGC-3'	733pb
LVC-99	5'-TTTTCTTCTAGAGTACTTTCTGG-3'	

Para verificar a integridade e tamanho do genoma viral no vetor, foi realizada digestão enzimática utilizando 4000 µg do vetor; 0,5 µL de albumina de soro bovino - BSA (10 µg/µL - Promega); 2,5 µL de tampão da enzima multicore®10X (Promega); 1 µL de Sall (12u/µL - Promega), e H<sub>2</sub>O até o volume final de 20µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Após esse período, os produtos da digestão sequencial, juntamente com um marcador de tamanho molecular, foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1X, acrescido de 1,2µL de Brometo de Etídio (10mg/mL) e a um potencial elétrico constante de 80 V por um tempo de 3 horas. Após este tempo, o gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta (MultiDoc-IT Digital Imaging System-UVP) e fotografado.

A colônia positiva para a presença do inserto foi cultivada em caldo LB contendo ampicilina (100ug/ml) por 18 horas a 37°C. Após esta etapa foi realizada a extração de DNA plasmidial *in house* e os plasmídeos obtidos foram armazenados a temperatura de -20°C até sua utilização.

## 7.2 Multiplicação do FIV-Petaluma

### 7.2.1 Transfecção de células CRFK com o vetor pFIV-14-Petaluma

Para este ensaio, monocamadas de células CRFK em uma placa de seis cavidades foram transfectadas com o vetor pFIV-14-Petaluma. Uma cavidade da placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentados 500 µL de meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de SFB, L-glutamina, antibióticos (gentamicina 40µg/mL e penicilina 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B 1,5µg/mL). Para este processo, 1 mL de uma solução contendo os “complexos de lipofetamina” foi adicionado a cada cavidade da placa. Os “complexos de lipofetamina” foram preparados, misturando uma solução contendo 2µg do vetor pFIV-14-Petaluma e 50 µL de Opti-MEM com uma segunda solução contendo 5µL de lipofetamina e 50 µL de Opti-MEM, sendo o volume completado para 1 mL com Opti-MEM. As células cobertas pela solução com os complexos de lipofetamina foram, então, incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 horas. Após esse período, o meio das células foi trocado, colocando 2 mL de meio DMEM suplementado com 2,5% de SFB, L-glutamina, antibióticos (gentamicina 40µg/mL e penicilina 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B 1,5µg/mL) em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Ao término das 48 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 minutos a 600 x g (microcentrifuga Thermo Eletron Corporation - CL17R). Os sedimentos foram suspensos com 500µL de meio DMEM suplementado com 2,5% de SFB, L-glutamina, antibióticos (gentamicina 40µg/mL e penicilina 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B 1,5µg/mL) e essa suspensão celular foi congelada e descongelada em refrigerador -80°C por três vezes, para lise das células. Finalmente, o lisado foi armazenado a -80°C para ensaios posteriores.

### 7.2.2 Infecção de Células CRFK

Para este ensaio, monocamada de células CRFK em placa de 6 poços foram infectadas com 200µL do lisado celular congelado obtido no item anterior. As células foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Ao término da incubação os poços foram completados com 1,8mL de meio

DMEM 2,5% SFB e incubada nas mesmas condições descritas anteriormente por 48 horas. Ao término, as monocamadas infectadas foram raspadas com auxílio de êmbolo de seringa de 1mL, coletadas e condicionadas em -20°C até o momento da extração de DNA e posterior PCR.

### 7.2.3 Verificação Indireta da presença do FIV Petaluma

A verificação da presença de ácidos nucleicos virais se deu pela verificação da presença do gene *gag* no interior das células CRFK infectadas (descritas anteriormente no item 7.1). A extração de DNA celular foi realizada pelo agente fenol-cloroformio (PCI) de acordo as instruções do fabricante. Para isto, foi adicionando 200 µL de PCI na proporção de 25:24:1 nas amostras previamente aquecidas a 99°C por 15 minutos. Após 20 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos à 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sobrenadantes foram coletados e adicionado 10% o volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos à 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R) e os sedimentos foram lavados com etanol 70% por duas vezes. Após as lavagens, os sedimentos foram suspensos em 30 µL de H<sub>2</sub>O. Os DNAs obtidos foram quantificados por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e utilizados em PCR como descrita anteriormente no item 7.1

### 7.2.4 Western Blot

A detecção de proteínas do FIV Petaluma foi realizada através de Western Blot.

Para este ensaio, 150µL do lisado obtido após a transfecção, foi utilizando para infectar a monocamada de células CRFK como descrito no item 2.1.2. Após esta etapa, as células foram incubadas por 24 e 48h. Ao término deste tempo,



foi realizada a extração de proteína total da monocamada infectada como descrita no item 2.2.2.

Para o ensaio de western Blot foram utilizados os soros de gatos naturalmente infectados por FIV, gentilmente cedidos pelo professor Jenner Reis (Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte) e o protocolo foi realizado como descrito no trabalho de Alves e colaboradores, 2013. Foi realizado bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente com TTBS 4% LPD (leite em pó desnatado), como anticorpo primário, foi utilizado o soro de gato positivo para FIV em uma concentração de 1:100, incubado por 1 hora temperatura ambiente e como anticorpo secundário um anticorpo anti-felino, produzido em cabra, conjugado com HRP (Immunology Consultants Lab, , Newberg, OR , USA ) em uma concentração de 1:1000, incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após esta incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TTBS e revelada com TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina).

## **8. Avaliação da Resposta humoral em animais imunizados com MVA-FIV**

### 8.1 Reconhecimento da proteína FIV/ENV<sup>P</sup> por soro de gatos naturalmente infectados pelo FIV

Para avaliar se os soros de gatos naturalmente infectados por FIV são capazes de reconhecer a proteína recombinante produzida pelo vírus MVA/FIV. Foi feita uma infecção de células BHK-21 (como descrito anteriormente em item 2.1.2). Após esta etapa foi feita a extração de proteínas totais e realizado o ensaio de Western Blot como descrito em 2.2.2.

## 8.2 Detecção de anticorpos contra a Proteína FIV/ENV<sup>P</sup> em soro de camundongos imunizados com MVA/FIV

Para verificar se o soro dos camundongos inoculados com MVA/FIV é capaz de reconhecer proteínas do vírus FIV Petaluma, foi feito um ensaio de Western Blot, no qual monocamada de células CRFK foram infectadas com lisado de células infectadas FIV Petaluma (como descrito anteriormente em item 2.1.2) e realizada uma extração de proteínas totais para a realização do ensaio como descrito em 2.2.2.

## 8.3 ELISA de peptídeos

Este experimento também foi utilizado para se verificar a produção de anticorpos específicos nos camundongos inoculados com o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>.

Para este ensaio, foram utilizados 2µg de cada peptídeo a ser testado, em 50µL de H<sub>2</sub>O mili-Q para cada poço. Como controle negativo foi utilizado somente H<sub>2</sub>O mili-Q para sensibilização. Após a adição dos peptídeos, as placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Ao término da incubação, a placa foi submetida a bloqueio com 150µL de 2,5% de caseína em PBS 1X. por 1 hora a 37°C. Após esta etapa a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (PBS 1x e 0,05% de Tween 20). Na placa, foram adicionados os soros a serem testados em uma diluição de 1:100 em tampão de incubação (1,25% de caseína em PBS 1X) e incubada por 1 hora a 37°C. Ao término da incubação, a placa foi lavada 4 vezes em solução de lavagem. Em seguida foi adicionado 100µL por poço do revelador (10mL de tampão citrato, 10mg de OPD e 10mg de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubada por 25 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Ao término, a reação foi parada com 25µL por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20. Ao término, a placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492nm.

## **9. Análise Estatística**

A análise estatística da comparação dos grupos foi feita submetendo os dados à análise de variância (ANOVA) e teste posterior de Turkey. Para este teste, os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativamente diferentes. As análises estatísticas foram feitas com o uso do software Prism 5 (GraphPad Software).

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### **1. Obtenção dos vírus de trabalho: MVA/FIV, MVA Selvagem e FIV subtipo**

#### **A**

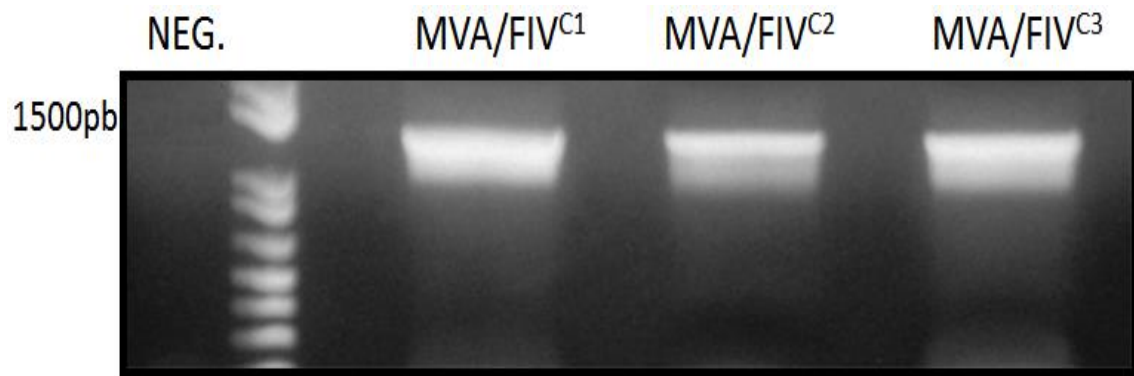
A construção dos vírus recombinantes foi baseada, a partir da recombinação homóloga em células BHK-21 infectadas com vírus MVA selvagem e transfectadas com o vetor pLW44 contendo o inserto com a região V1-V3 do gene do envelope do FIV. Em trabalho prévio de mestrado, intitulado Geração de um vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) expressando a região variável 1-3 da proteína do envelope do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), foi selecionado o clone MVA/FIV<sup>C1</sup>, no presente trabalho foram selecionados outros dois clones virais, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> por meio de sucessivos ensaios de purificação de placa. Após a seleção, os vírus recombinantes foram amplificados, purificados, titulados e tiveram o gene inserido, sequenciado. O título do estoque de trabalho obtidos para o clone viral MVA/FIV<sup>C1</sup> foi de  $7,3 \times 10^9$  UFP,  $3,9 \times 10^9$  para o clone MVA/FIV<sup>C2</sup> e de  $5,8 \times 10^8$  UFP para o clone MVA/FIV<sup>C3</sup>. Paralelamente foi realizada a Amplificação, purificação e titulação do MVA selvagem, utilizado nas imunizações dos camundongos. Este vírus obteve um título de  $1,5 \times 10^{10}$  UFP.

#### 1.1 Verificação da Presença do inserto nos clones virais

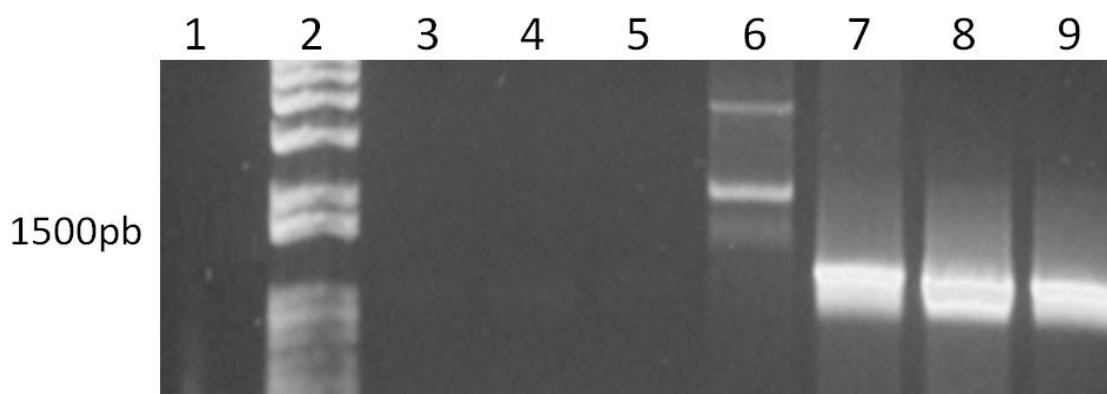
Para confirmar da presença do inserto nos vírus recombinantes primeiramente foi infectada uma monocamada células BHK-21 com os respectivos vírus e em seguida foi feita a extração de DNA e RNA por meio de TRI ® Reagent (SIGMA-ALDRICH-EUA). O vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> foi utilizado como um controle positivo. O DNA obtido foi guardado em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso em experimentos subsequentes.

Primeiramente foi feita uma PCR para verificar a presença do amplificado de aproximadamente 1389pb correspondendo a região V1-V3 do envelope do vírus (FIGURA 09). Após a confirmação da presença do inserto foi realizada uma

RT-PCR para comprovar a produção de RNA mensageiro específico para a sequência de interesse. (FIGURA 10).



**FIGURA 09: Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese, para verificação de presença de vírus recombinantes com a sequência de DNA de interesse.** Onde a canaleta Neg. representa o controle negativo da reação. A PCR do cDNA dos vírus MVA/FIV<sup>A</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> apresentaram o inserto de aproximadamente 1389pb.



**FIGURA 10: Foto de Gel de agarose 1% após eletroforese, para verificação de presença de vírus recombinantes expressando mRNA de interesse.** Amplificação da região V1-V3 do gene *env* nos vírus recombinantes MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup>. Esta PCR foi realizada utilizando como molde de DNA, o cDNA da RT-PCR a partir do RNAm extraído da cultura celular. Canaleta 1: Controle negativo, Canaleta 2 Padrão de peso molecular destacando a altura de 1500pb, As canaletas 3, 4 e 5 representam a reação de PCR utilizando ao invés de DNA, o RNA extraído dos vírus MVA/FIV<sup>A</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> respectivamente. Canaleta 6: RNA extraído do MVA/FIV<sup>C1</sup>, as canaletas 7, 8 e 9 são o resultado da PCR dos vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> respectivamente utilizando cDNA como molde para a reação.

## 1.2 Sequenciamento nucleotídico

Para verificar a presença de diferenças genéticas insertos presentes nos clones virais, foi realizado o sequenciamento nucleotídico através da PCR do cDNA dos MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> e o amplificado foi purificado de gel de agarose 0,8% utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (PROMEGA, EUA)

A partir dos eletroferogramas foi gerado uma sequência consenso utilizando a plataforma *Electropherogram quality analysis* como descrito anteriormente e os consensos gerados foram comparados com a sequência do

pGEMT/FIV utilizada para a construção dos vírus recombinantes. Para comparação das sequências gênicas foi utilizada a plataforma *Multalign* (FIGURA 11).

O sequenciamento demonstrou que o vírus MVA/FIV<sup>C2</sup> não teve um sequenciamento integral, faltando aproximadamente 50 bases. Comparando o perfil do sequenciamento dos três clones virais, é possível observar uma igualdade genética entre eles e ao serem comparados com o plasmídeo pGEMT/FIV, utilizado na construção dos vírus recombinantes.



	101										200
pGEMT/FIV								CCTCCC	GGGATGTTTA	GGGTACCAGG	CATTACGTCA
MVA/FIV_C1	ATTGAAAATA	AATACAAAGG	TTCTTGAGGG	TTGTGTTAAA	TTGAAAGCGA	GAAATAATCA	TAAATAAG..	C.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	ATTGAAAATA	AATACAAAGG	TTCTTGAGGG	TTGTGTTAAA	TTGAAAGCGA	GAAATAATCA	TAAATAAG..	C.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	ATTGAAAATA	AATACAAAGG	TTCTTGAGGG	TTGTGTTAAA	TTGAAAGCGA	GAAATAATCA	TAAATAAG..	C.....	.....	.....	.....
Consensus	attgaaaata	aatacaaagg	ttcttgaggg	ttgtgtttaa	ttgaaagcga	gaaataatca	taaataag..	c.....	.....	.....	.....
	201										300
pGEMT/FIV	CAGGAAAAGG	ATGATTATTG	TAAGATCTTA	CAAACAAAAC	TACAAGAATT	AAAGAATGAA	GTCAAAGAGG	TAAAAATTGA	AGAAGAAAAT	GCAGGTAAGT	
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	301										400
pGEMT/FIV	TTAGGAGGGC	AAGATATTTA	AGATATTCTG	ATGAAAATGT	GCTATCCATG	GTCTATCTGC	TAATAGGATA	TCTAAGATAT	TTAATAGATC	GTAGGAGTTT	
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	401										500
pGEMT/FIV	AGGATCCTTG	AGGCATGATA	TAGACATAGA	AACACCTCAA	GAGGAACATT	ACAGTAATAG	TGAAAAAGGT	ACCACATTAA	ATATGAAATA	TGGAAAAAGA	
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

501 600

pGEMT/FIV TGTTGTATTA GTACATTGAT TATGTATTTA ATCCTTTTTG CAGGAGTAAT CTGGTTTGGG GCTAGGGCGC AAGTAGTGTG GAGACTTCCC CCTTTAGTAG

MVA/FIV\_C1 .....

MVA/FIV\_C3 .....

MVA/FIV\_C2 .....

Consensus .....

601 700

pGEMT/FIV TTCCAGTAGA TGATACAGAA ATAGTATTTT GGGATTGTTG GCGGCCAGAG GAACCGGCTT GTCAAGATTT CTTGGGAACG ATGATACATT TAAAAGCAAA

MVA/FIV\_C1 .....

MVA/FIV\_C3 .....

MVA/FIV\_C2 .....

Consensus .....

701 800

pGEMT/FIV TGTCAATATA AGTATAACAAG AAGGACCTAC ATTGGGAAAT TGGGCAAGAG AAATTTGGTC CACATTATTT AAAAAGGCTA CGAGGCAATG TAGAAGGGGG

MVA/FIV\_C1 .....

MVA/FIV\_C3 .....

MVA/FIV\_C2 .....

Consensus .....

801 900

pGEMT/FIV AGAATCTGGA AGAAATGGAA TGAAACTATA ACAGGACCAA TGGGATGTGC AAACAATACC TGTTATAATA TCTCGGTAGT GGTACCTGAT TATCAATATT

MVA/FIV\_C1 .....

MVA/FIV\_C3 .....

MVA/FIV\_C2 .....

Consensus .....

901 1000

pGEMT/FIV	ATGTAGACAG	AGTAGATACA	TGGTTGCAAG	GGAAAGTTAA	TATTTCACTA	TGTTTGACAG	GAGGAAAGAT	GCTATACAAT	AAAGAAACAA	GACAATTAAG
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1001									1100
pGEMT/FIV	TTATTGTACA	GATCCACTGC	AAATTCCATT	GATTAATTAT	ACATTTGGGC	CTAATCAAAC	TTGTATGTGG	GACATATCTT	TGATCAAAGA	TTCTGAGATA
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1101									1200
pGEMT/FIV	CCAAAATGTG	GATGGTGGAA	CCAAAAGGCT	TATTATAAAG	CTTGTAATG	GGAAGAAGCT	AATGTGACAT	TTCAGTGTCA	CAGAACACAA	AGTCAACCAG
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1201									1300
pGEMT/FIV	GATCATGGAG	TAGAATAATC	TCTTCTTGGA	GACAAAGAAA	TAGATGGGAA	TGGAGGCCAG	ACTTTGAAAG	TGAGAAAGTA	AAAATAGCAT	TACAATGTAA
MVA/FIV_C1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
MVA/FIV_C2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1301									1400
pGEMT/FIV	TAGTACAAAA	AATTTAACGT	TTGCAATGAG	AAGTTCAAGT	GATTATTATG	ATGTACAAGG	AGCATGGATA	GAATTTGGAT	GCCATAGGAA	GAAATCAAAA

```

MVA/FIV_C1 .....
MVA/FIV_C3 .....
MVA/FIV_C2 .....
Consensus .....

1401 1500
pGEMT/FIV AGGCACTCTG AAGCAAGATT TAGAATAAGA TGTAATGGA ATGAAGGAAA TAATATTTCC CGTATTGATA CATGTGGAAC AAATCCGAAT GTCACAGGAG
MVA/FIV_C1 .....
MVA/FIV_C3 .....
MVA/FIV_C2 .....
Consensus ..... .tgaaggaaa taatatttcc cgtattgata catgtggaac aaatccgaat gtcacaggag

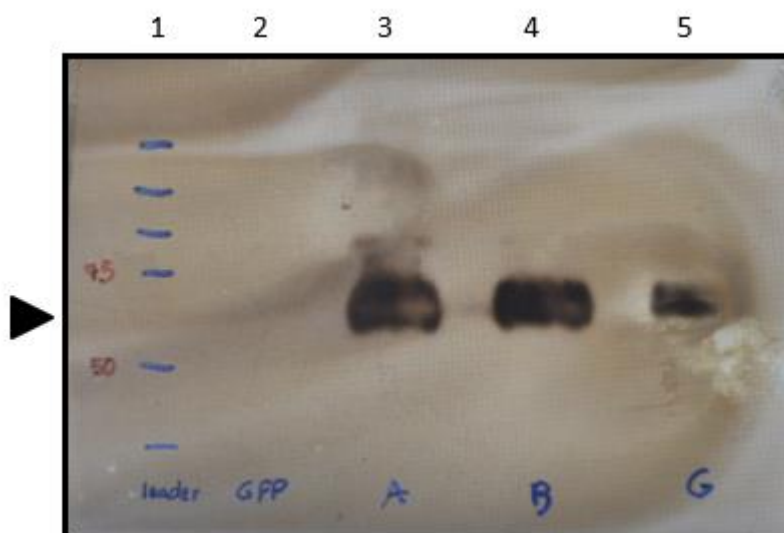
1501 1600
pGEMT/FIV CCAACCCGGT AGATTATAAA GATGATGATG ACAAATAGTA ACTGCAG
MVA/FIV_C1 .....
MVA/FIV_C3 .....
MVA/FIV_C2 .....
Consensus ccaacccggt agattataaa gatgatgatg acaaatagta actgcag

```

**FIGURA 11: Sequenciamento nucleotídico do gene exógeno dos vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup>, MVA/FIV<sup>C3</sup>, comparados com o plasmídeo pGEMT/FIV, usado para obtenção do inserto utilizado na recombinação com os vírus MVAs selvagens. Destacando em amarelo, o sítio de restrição Smal e em verde o sítio de restrição PstI.**

### 1.3 Western Blot

Este experimento foi realizado para se verificar a produção da proteína alvo pelos vírus MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> após a infecção de monocamada de células BHK-21 e extração de proteínas totais, complementando-se aos resultados positivos obtidos pela comprovação da produção dos respectivos mRNAs. Como controles negativos foram utilizadas células não infectadas e células infectadas com MVA expressando somente a proteína verde fluorescente (GFP), e como controle positivo o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> (FIGURA 12)



**FIGURA 12: Fotografia do Western Blot para verificar a produção de proteína de interesse pelos vírus MVA/FIV clones 1, 2 e 3.** Canaleta 1: Padrão de peso molecular com destaque para a o tamanho de 55kDa. Canaleta 2: Controle negativo, representado por extrato proteico de células infectadas com MVA selvagem expressando GFP. Canaleta 3: extrato proteico de células infectadas com MVA/FIV<sup>C1</sup>. Canaleta 4: extrato proteico de células infectadas com MVA/FIV<sup>C2</sup>. Canaleta 5: extrato proteico de células infectadas com MVA/FIV<sup>C3</sup>.

Apesar da identidade genética entre os três vírus recombinantes, o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> foi utilizado para a realização dos experimentos posteriores por apresentar o maior título viral e maior expressão de proteína verificada através do Western Blot.

## 2. Avaliação da viabilidade ao longo do tempo de estocagem (*shelf-life*) do Vírus MVA/FIV

A viabilidade do vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> foi verificada após o processo de liofilização das amostras virais seguida por uma estocagem pelo período de três meses em temperatura de geladeira a 4°C. Esta é uma avaliação básica para qualquer produto vacinal que tenha a pretensão de ser avaliado clinicamente, no futuro.

Os dados obtidos dispostos na tabela 4 nos indicam que após o tempo de estocagem, não houve queda logarítmica do título viral.

**TABELA 4: Título do vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> liofilizado e não liofilizado.**

<b>Tempo</b>	<b>Título</b>
MVA/FIV <sup>C1</sup> estocado a -80°C	7,3 x 10 <sup>9</sup>
MVA/FIV <sup>C1</sup> após liofilização	7,2 x 10 <sup>9</sup>
MVA/FIV <sup>C1</sup> após 3 meses de liofilização e armazenado à 4°C	2,7 x 10 <sup>9</sup>

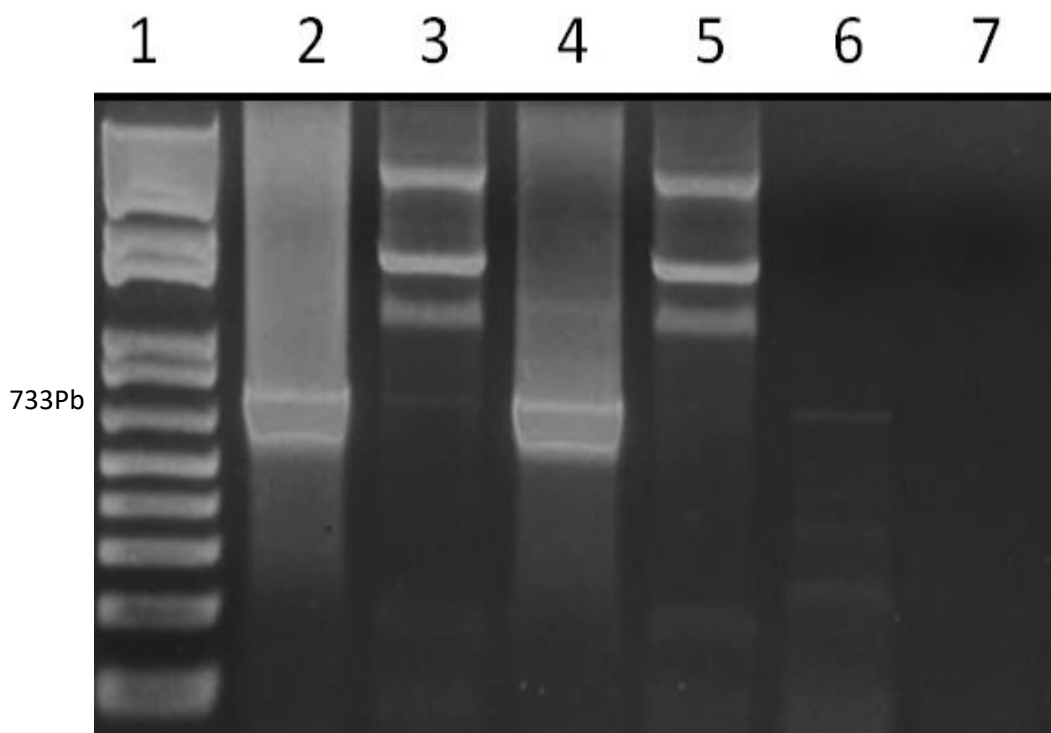
### 3. Obtenção do vírus FIV Petaluma

O objetivo de produzir o vírus FIV Petaluma, pertencente ao subtipo A, foi utilizar as proteínas virais em posteriores ensaios, para avaliar a especificidade da resposta gerada pelos camundongos imunizados contra o vírus vacinal, subtipo B.

Para isto, bactérias *E. coli* XL-10 GOLD, foram transformadas com o plasmídeo pFIV-14-Petaluma e após a incubação, 3 colônias foram escolhidas para a triagem. A seleção consistiu em PCR de colônia e extração de DNA plasmidial por Miniprep “*in house*” para ensaio de restrição enzimática.

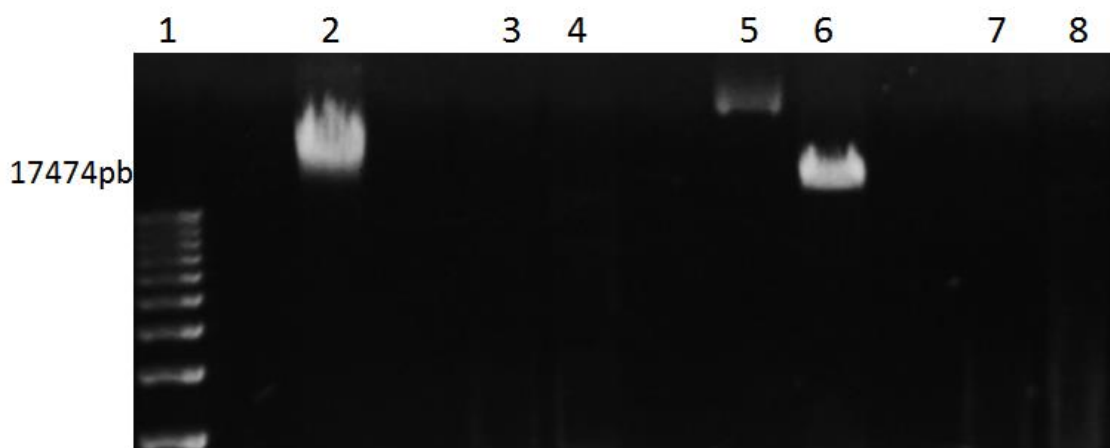
A PCR de colônia (FIGURA 13) indicou que somente a colônia 2 amplificou a região do *gag* quando comparamos com o controle positivo que consistia no plasmídeo fechado e a amostra DNA Salomé, que consiste em uma amostra de DNA oriunda de um gato naturalmente infectado com FIV subtipo B,

A restrição enzimática corroborou o resultado obtido na PCR, onde é possível observar que a colônia 2 liberou o fragmento de aproximadamente 17.474pb (FIGURA 14). Indicando que esta colônia apresenta o plasmídeo contendo o genoma viral.



**FIGURA 13: Foto de Gel de agarose 1% onde é observada a PCR de colônias após a transformação com o plasmídeo pFIV-14-Petaluma seguida de incubação por 24h.** Canaleta 1: padrão de tamanho molecular; Canaleta 2: Plasmídeo pFIV-14-Petaluma; Canaleta 3: Colônia 1; Canaleta 4: Colônia 2; Canaleta 5: Colônia 3; Canaleta 6: DNA Salomé (Extração de DNA de gato, com viremia por FIV<sub>Subtipo B</sub>) e Canaleta 7: controle negativo.





**FIGURA 14: Foto de Gel de agarose 1%, onde é observada a restrição enzimática dos clones bacterianos transformados com o plasmídeo pFIV-14-Petaluma.** Canaleta 1: padrão de tamanho molecular com destaque para a o tamanho de 17474pb; Canaleta 2: Plasmídeo pFIV-14-Petaluma fechado; Canaleta 3 e Canaleta 4: : plasmídeo não digerido e digerido da colônia 1; Canaleta 5 e Canaleta 6: plasmídeo não digerido e digerido da colônia 2; Canaleta 7 e Canaleta 8: plasmídeo não digerido e digerido da colônia 3.

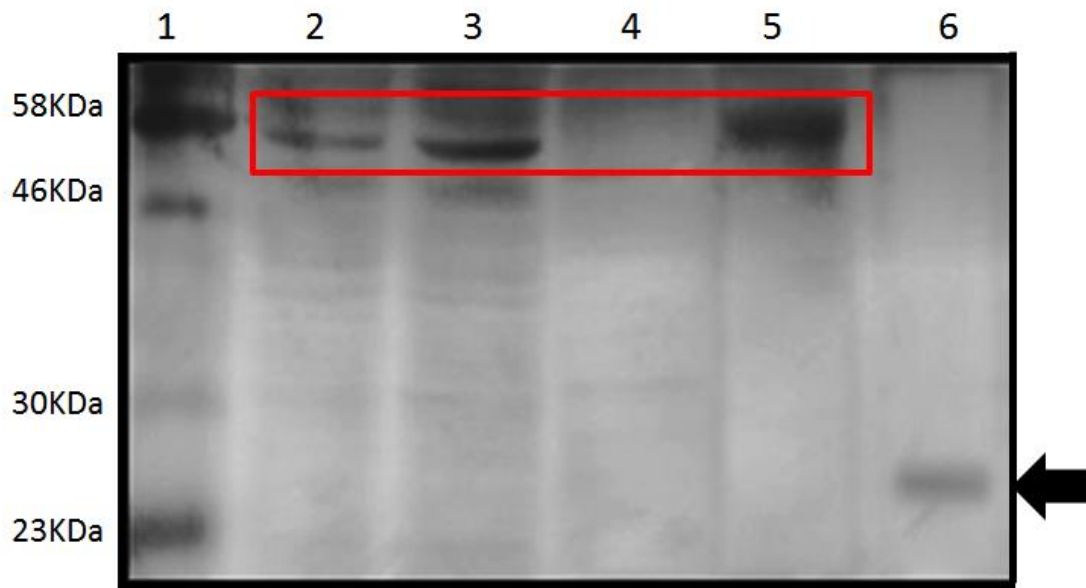
### 3.1 Transfecção de células CRFK

O plasmídeo pFIV-14-Petaluma obtido da colônia bacteriana N°2, foi utilizado para fazer a transfecção da monocamada de células CRFK. Sabe-se que a amostra viral FIV Petaluma forma sincícios em células infectadas. Porém, este tipo de alteração não foi observado nas células transfectadas. Não obstante, após a incubação de 48 horas subsequentes à transfecção, foi possível observar que o meio de cultura sofreu uma alteração de pH, tornando-se amarelado. Esta alteração não foi observada no controle negativo, constituído por células não transfectadas.

### 3.2 Western Blot de células infectadas com FIV Petaluma

Um *pool* de soros de gatos naturalmente infectados com FIV foi utilizado para avaliar se estes soros eram capazes de reconhecer FIV subtipo A, além de verificar se as células infectadas com o vírus FIV Petaluma estavam produzindo antígenos virais. Para realizar o Western Blot, foram utilizados extratos proteicos totais de monocamadas de células CRFK infectadas e não infectadas com o vírus FIV Petaluma, que pertence ao subtipo A. Paralelamente, este *pool* de soros também foi utilizado para a detecção de proteínas produzidas em monocamadas de células BHK-21 com vírus vacinal MVA/FIV<sup>C1</sup>.

Ao observar a membrana (FIGURA 15) nota-se que o soro dos gatos reconheceu o controle positivo (canaleta 6), composto pela recombinante proteína p24, pertencente ao capsídeo do vírus, cedida pelo professor Dr. Jenner Reis (Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte). O soro dos gatos FIV<sup>+</sup> também foi capaz de reconhecer proteínas na altura de aproximadamente 55KDa nas células CRFK infectadas com FIV Petaluma (24 e 48h de infecção) e nas células BHK-21 infectadas com MVA/FIV. Este padrão de reconhecimento não se repete nas células CRFK não infectadas. Sugerindo que estas bandas representam proteínas virais presentes no extrato proteico das células infectadas.



**FIGURA 15: Western Blot** utilizando como anticorpo primário um *pool* de soros de gatos naturalmente infectados por FIV. Canaleta 1: o padrão de peso molecular, Canaleta 2: Células CRFK 24h após infecção com FIV Petaluma, Canaleta 3 Células CRFK 48h após a infecção com FIV Petaluma, Canaleta 4: Células CRFK não infectadas; Canaleta 5 Células BHK-21 infectadas com vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> e Canaleta 6: Proteína p24, A seta destaca a banda de 24KDa. O retângulo destaca o tamanho de aproximadamente 55KDa, mostrando as bandas presentes nas canaletas 2,3 e 5, representadas por células infectadas com FIV Petaluma ou MVA/FIV<sup>C1</sup> e ausente nas células não infectadas.

#### 4. Identificação de Epítomos CD8<sup>+</sup> para a região V1-V3 da proteína do envelope de FIV

A identificação de epítomos CD8 para a proteína parcial do envelope do FIV teve como objetivo gerar peptídeos capazes de estimular linfócitos responsivos à vacina em questão.

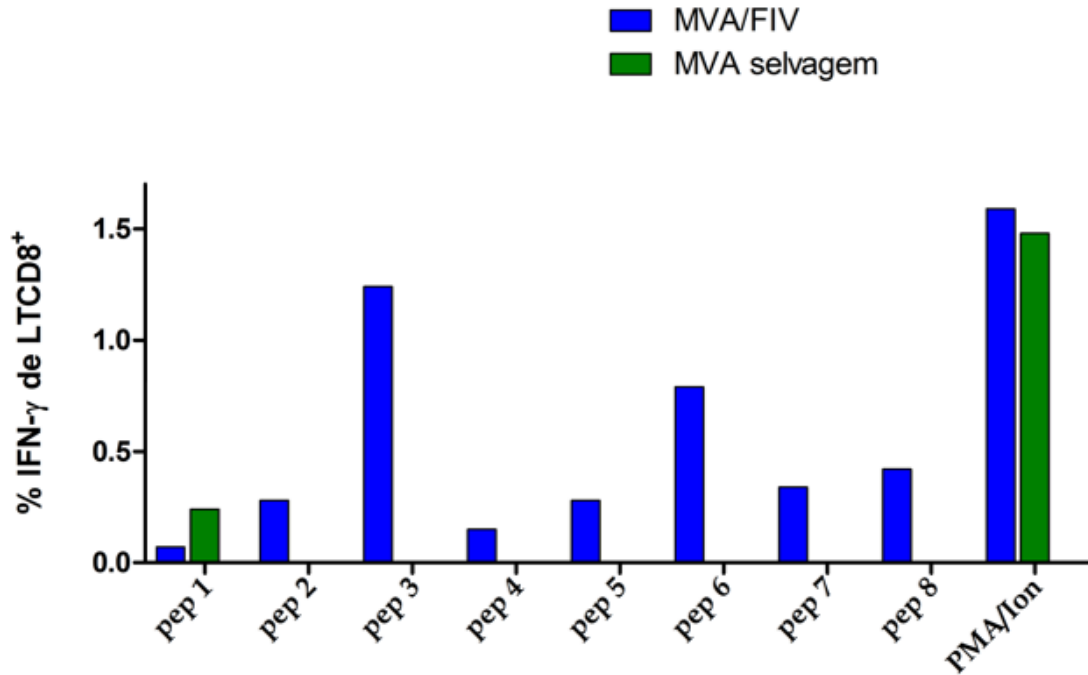
A partir da sequência de aminoácidos da região V1-V3 do envelope do FIV, as plataformas estas plataformas (HLA *Peptide Binding Predictions* e *Immune Epitope Database and Analysis Resource*) geraram uma lista de prováveis candidatos, cada um com sua pontuação. Para fazer uma análise mais apurada, foram utilizados dois critérios de seleção: Peptídeos com pontuações altas e peptídeos que fossem identificados por ambas as plataformas. Assim, foram escolhidos 8 peptídeos que foram sintetizados pela empresa GENONE – Brasil e listados na tabela a seguir (TABELA 2)

## **5. Avaliação da Resposta Imune Celular Específica em animais imunizados com a vacina MVA/FIV**

### **5.1 Avaliação *in vitro* dos peptídeos sintéticos**

A partir deste resultado foi possível observar que quase todos os peptídeos sintéticos foram capazes de estimular, em maior ou menor grau, os Linfócitos TCD8<sup>+</sup> dos animais inoculados com MVA/FIV<sup>C1</sup>. Apesar de nenhum desses peptídeos estar presente nas proteínas expressas naturalmente pelo MVA selvagem, é observado que o peptídeo 1 gera estimulação inespecífica no grupo MVA selvagem (FIGURA 16).

Estes resultados ajudaram a identificar os peptídeos 3 (SMVYLLIGYL) e 6 (VWRLPPL). como sendo os que apresentaram melhor desempenho na estimulação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>.



**FIGURA 16: Estimulação de esplenócitos de camundongo C57BL/6 inoculados com MVA/FIV<sup>C1</sup> e MVA selvagem.** Nesse gráfico é possível observar em verde a produção de IFN pelos esplenócitos camundongos inoculados com MVA selvagem e em azul a dos camundongos inoculados com MVA/FIV<sup>C1</sup>. O PMA/Ionicina é um estimulador inespecífico, sendo utilizado como controle positivo de estimulação. Pep1 ao Pep 8 correspondem aos peptídeos avaliados no experimento, onde observa-se que o peptídeo 3 apresentou o melhor desempenho. É possível observar que os peptídeos sintéticos estimulam as células dos animais inoculados com MVA/FIV<sup>C1</sup> quando comparados com o controle positivo (PMA/ Ionicina e Peptídeo A3)

## 5.2 Análise da proliferação celular CFSE

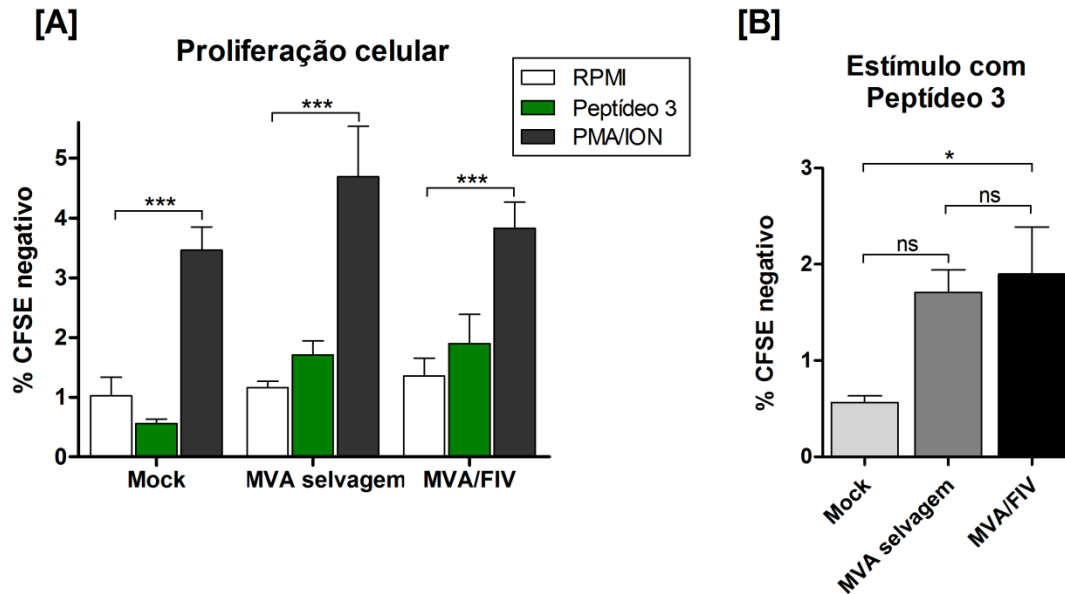
Após a identificação do peptídeo sintético capaz de estimular de forma significativa os linfócitos responsivos ao antígeno de FIV produzido pelo vetor viral vacinal, este mesmo peptídeo foi utilizado para o ensaio de proliferação

celular. Neste, o objetivo foi avaliar, de forma balizada, a intensidade da resposta celular induzida pela imunização de animais com a vacina MVA/FIV.

Este ensaio demonstrou que houve proliferação nos três grupos celulares esplenócitos de animais inoculados com MVA selvagem, MVA/FIV e não inoculados. Pois, é possível observar uma diferença significativa ( $P < 0,001$ ) dentro de cada grupo ao compararmos a proliferação das células que estiveram em contato com o controle de proliferação, PMA e Ionomicina, com as esplenócitos que estiveram em contato com o controle negativo, RPMI.

No ensaio de proliferação celular foi verificada a capacidade estimulatória do peptídeo 3 (SMVYLLIGYL) quando comparado com o estímulo positivo de estimulação (PMA e Ionomicina) e o estímulo negativo (meio de cultura RPMI) em três grupos de estudo, camundongos não vacinados (*Mock*), vacinados com MVA selvagem e vacinados com MVA/FIV. Os dados sugerem uma diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre o estímulo positivo quando comparado com as células com estímulo negativo, indicando que houve proliferação celular nas células estimuladas. (FIGURA 17-A).

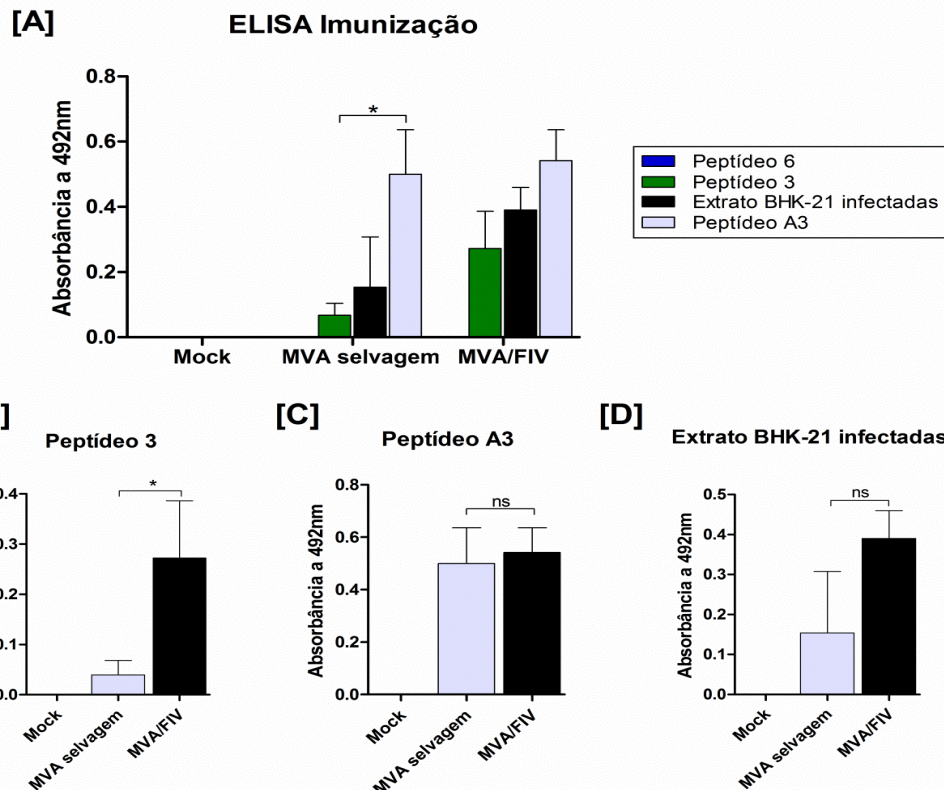
Ao comparar estatisticamente a resposta estimulatória do peptídeo 3 (SMVYLLIGYL) entre os diferentes grupos de estudo, foi possível observar que grupo MVA/FIV apresentou uma resposta proliferativa significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo *mock*. Embora não tenha sido observada resposta significativa entre os grupos MVA selvagem e MVA/FIV, também não foi observada diferença significativa entre MVA selvagem e *mock* (FIGURA 17-B).



**FIGURA 17: Ensaio de proliferação celular por CFSE.** [A]: Ensaio de proliferação celular com as células esplênicas dos camundongos inoculados com Tris-HCl (Mock), MVA selvagem e MVA/FIV<sup>C1</sup> submetidos aos estímulos Peptídeo 3 (SMVYLLIGYL), PMA/Ionicina e controle negativo representado por meio de cultura celular RPMI. As barras representam a média da porcentagem das células que proliferaram  $\pm$  erro padrão entre os grupos (n = 5). Destacando a diferença significativa de  $P < 0,001$  entre o estímulo RPMI e o PMA/IONOMICINA indicando que houve proliferação celular nas células estimuladas. [B]: Comparação entre os diferentes grupos de esplenócitos de camundongos submetidos ao estímulo com o Peptídeo 3 (SMVYLLIGYL).

## 6. Avaliação da resposta humoral após imunização de camundongos com a vacina

### 6.1 Avaliação dos peptídeos sintéticos 3 e 6 por meio de ELISA



**FIGURA 18: ELISA de peptídeos sintéticos.** [A]: Representação da absorbância do soro de três grupo vacinais ( Grupo *Mock*, grupo inoculado com MVA selvagem e grupo inoculado com MVA/FIV) submetidos a diferentes estímulos. Peptídeo 6, Peptídeo 3, Peptídeo A3 e Extrato de proteínas de células BHK-21 infectadas com MVA/FIV. Onde é possível observar que o grupo *Mock* não respondeu a nenhum estímulo. Além disso é possível observar que houve uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no grupo MVA selvagem ao comparar o estímulo pelo peptídeo 3 quando comparado ao estímulo pelo peptídeo A3, presente no arcabouço do vírus *Vaccinia*. [B]: comparação do estímulo pelo peptídeo 3, onde é observa-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos MVA/FIV e o MVA selvagem. Sugerindo que este estímulo é específico aos animais inoculados com o vírus vacinal. [C]: Observa-se que não houve diferença significativa nos grupos MVA selvagem e MVA/FIV quando submetidos ao peptídeo A3. [D]: Constata que não houve diferença significativa entre o grupo MVA selvagem e o grupo MVA/FIV quando submetidos ao estímulo composto por extrato proteico de células BHK-21 infectadas com MVA/FIV<sup>C1</sup>.



A partir dos resultados obtidos (FIGURA 18-A), é possível observar que o grupo *Mock* não apresentou uma absorvância significativa, quando comparada aos grupos vacinados com MVA selvagem e MVA/FIV em nenhuma das estimulações testadas (peptídeo 6, peptídeo 3, peptídeo A3 e extrato de proteínas totais de células BHK-21 infectadas com MVA/FIV), somado a isto, observa-se que o peptídeo 6 não gerou nenhuma estimulação detectável em nenhum grupo estudado.

Ao comparar os dados obtidos através do uso do peptídeo 3 nos três grupos vacinais (FIGURA 18-B), podemos observar este peptídeo não gerou estímulo detectável no grupo *Mock*, além disso, observa-se que houve uma diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre o grupo inoculado com MVA selvagem e MVA/FIV. Isto comprova a especificidade deste peptídeo para as células dos animais inoculados com o vírus recombinante.

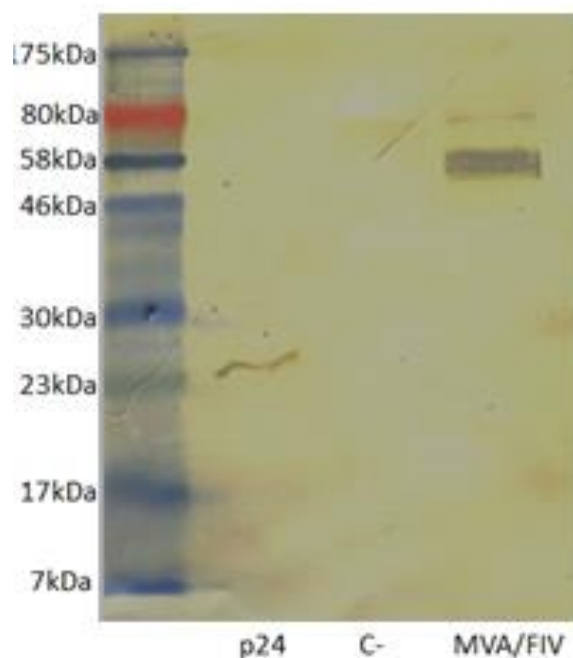
O peptídeo A3 (KSYNYMLL), foi utilizado como um controle positivo de ativação, pois, este peptídeo faz parte do arcabouço dos vírus *Vaccinia*. Devido a isto, espera-se deste peptídeo a ativação dos esplenócitos dos grupos inoculados com MVA selvagem e MVA/FIV, e a ausência de resposta no grupo *mock* como foi observado neste experimento (FIGURA 18-C)

O estímulo extrato de BHK-21 consiste em extrato de proteínas totais de células BHK-21 infectadas com MVA/FIV (FIGURA 18-D). Este estímulo foi utilizado para avaliar a diferença na resposta do grupo MVA selvagem com o grupo MVA/FIV. A partir desse resultado é possível observar que o grupo vacinado com o vetor recombinante apresentou uma resposta maior que o grupo MVA selvagem.

## 6.2 Reconhecimento das proteínas recombinantes produzidas por células infectadas por MVA/FIV<sup>C1</sup> por soro de gatos naturalmente infectados por FIV

Para avaliar se o *pool* de soros de gatos naturalmente infectados com FIV seria capaz de reconhecer a proteína recombinante expressa pelo MVA/FIV, foi realizado o ensaio Western Blot com extrato de proteínas totais de células BHK-21 infectadas com o vírus vacinal.

O Western Blot indicou que o pool de soros de gatos naturalmente infectados com FIV é capaz de reconhecer a proteína recombinante expressa pelo vírus MVA/FIV, assim como também foi capaz de reconhecer o controle positivo constituído pela proteína P24 do capsídeo do FIV, que é amplamente utilizada no diagnóstico de FIV. O pool de soros não reconheceu nenhuma proteína do mesmo tamanho no controle negativo, que consistiu no extrato de células BHK-21 não infectadas (FIGURA 19).

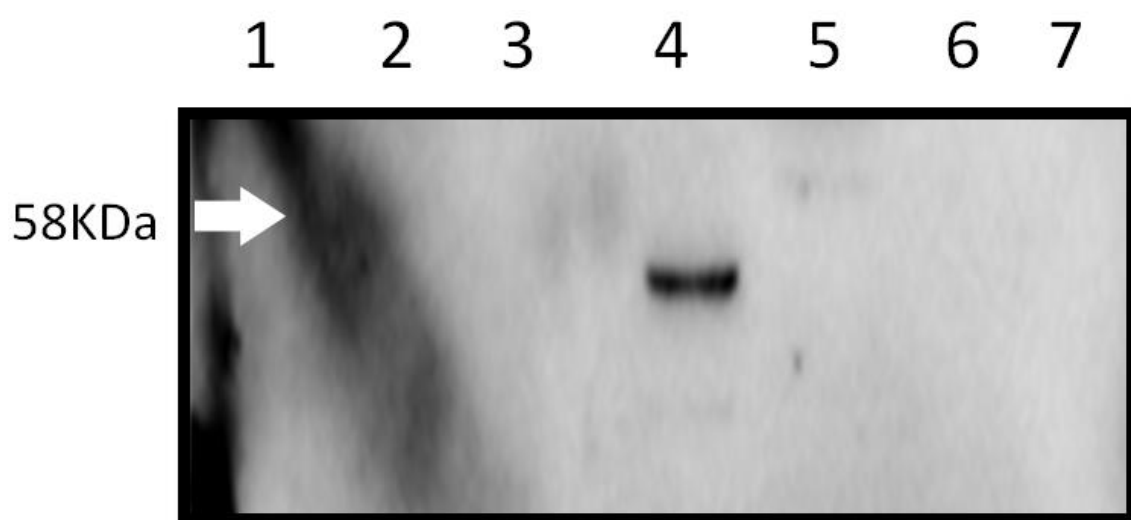


**FIGURA 19: Wester Blot utilizando soro de gatos naturalmente infectados com FIV reconhecendo a proteína recombinante produzida por células infectadas com MVA/FIV<sup>C1</sup>.** É possível observar que o *pool* de soros dos gatos positivos para FIV marcaram o controle positivo que consiste na proteína p24, do capsídeo do FIV. O controle negativo é representado pelo extrato de proteínas totais de células BHK-21 enquanto a amostra MVA/FIV consiste no extrato de proteínas totais de células BHK-21 infectadas com o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>. É possível observar que nesta amostra, o soro dos gatos marcou a proteína recombinante que possui um tamanho de 55KDa.

### 6.3 Reconhecimento de proteínas do FIV Petaluma e MVA/FIV<sup>C1</sup> pelo soro de camundongos inoculados com MVA/FIV<sup>C1</sup>

Para avaliar a capacidade dos camundongos inoculados com o vírus vacinal em gerar resposta humoral contra a proteína recombinante, o soro total dos animais imunizados foi obtido após a eutanásia. A reatividade destes soros contra antígenos pertencentes ao FIV Petaluma, pertencente ao subtipo A de FIV, também foi avaliada.

Por meio desse resultado é possível observar que os anticorpos gerados pela vacina embora sejam capazes de reconhecer a proteína recombinante produzida pelas células infectadas com o MVA/FIV, eles não são capazes de reconhecer a proteínas do FIV subtipo A (Petaluma) e nem a proteína p24 do capsídeo do FIV, sugerindo que os anticorpos produzidos pela vacina são específicos para a região V1-V3 de FIV subtipo B (FIGURA 20).



**FIGURA 20: Western Blot utilizando como anticorpo primário soro de camundongos inoculados com o vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>. Canaleta 1: o padrão de peso molecular, Canaleta 2: Células CRFK 24h após infecção com FIV Petaluma, Canaleta 3 Células CRFK 48h após a infecção com FIV Petaluma,**

Canaleta 4 Células BHK-21 infectadas com vírus MVA/FIV<sup>C1</sup>, Canaleta 5: Células BHK-21 não infectadas, Canaleta 6: Células CRFK não infectadas e Canaleta 7: Proteína p24.

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Desde sua descoberta em 1986, inúmeras tentativas de desenvolver uma vacina eficiente contra o FIV tem sido feitas. Atualmente, dos cinco subtipos de vírus circulantes mundialmente, temos vacina disponível somente para o subtipo A. Até o momento só foi encontrado FIV subtipo B circulando no Brasil e, ao possuir a segunda maior população de gatos domésticos do mundo, o País encontra-se numa posição vulnerável em relação a este vírus. Por isto, este trabalho teve como objetivo suprir esta demanda nacional, com a construção de uma vacina contra o FIV subtipo B.

A estratégia desta vacina se baseou na utilização do vetor viral recombinante MVA. Este vetor é um poxvirus atenuado que possui o ciclo de multiplicação incompleto na maioria das células de mamíferos, embora seja capaz de gerar proteínas estruturais virais e também aquelas recombinantes. Com isto, as proteínas produzidas durante seu ciclo de multiplicação na célula hospedeira, podem ser processadas e apresentadas para as células pertencentes do sistema imune, gerando assim respostas tanto humorais quanto celulares.

A construção inicial dos vírus vacinais MVA/FIV foi realizada em trabalho prévio de mestrado. Nesse período foram obtidos três clones virais. MVA/FIV<sup>C1</sup>, MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup>. Porém, somente o MVA/FIV<sup>C1</sup> foi amplificado, purificado e titulado anteriormente. Os vírus MVA/FIV<sup>C2</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> foram selecionados, amplificados, purificados e titulados durante este trabalho de doutorado.

Os três clones virais foram submetidos a sequenciamento e foi observado que vírus MVA/FIV<sup>C2</sup> apresentou um sequenciamento incompleto, faltando aproximadamente 50pb da região 3' enquanto que os vírus MVA/FIV<sup>C1</sup> e MVA/FIV<sup>C3</sup> tiveram um sequenciamento nucleotídico completo. Ao comparar as sequências dos vírus com o plasmídeo pGEMT/FIV (utilizado na construção do vírus) foi observado que elas alinham-se perfeitamente, havendo somente diferença em relação ao sitio de restrição SmaI. Os três vírus sequenciados

apresentaram troca de base neste sitio de restrição. Porém, como no vetor vacinal este sitio não interfere na expressão gênica, as construções virais foram consideradas satisfatórias (FIGURA .11).

Para verificar a produção da proteína recombinante pelos três clones virais, foi realizado Western Blot (FIGURA 12), cujo resultado positivo, confirmou a expressão da proteína de interesse e, por consequência, corroboração da obtenção de vírus vacinais potencialmente efetivos. Comparando o desempenho dos três clones virais no Western Blot, sequenciamento e título viral, foi escolhido o clone MVA/FIV<sup>C1</sup> para prosseguir com este trabalho.

Por se tratar de um protótipo vacinal, este trabalho teve como principal objetivo avaliar 3 fundamentos, a estabilidade da vacina, a resposta celular e a resposta humoral geradas em modelo murino.

Visando o apelo comercial da vacina, a estabilidade do vírus foi avaliada pelo período de três meses em temperatura de 4°C após a liofilização. Após este período, foi observado que não houve queda no log do título viral quando comparado com o vírus estocado na coleção de vírus e material biológico do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada. Demonstrando assim a estabilidade pelo tempo estudado (TABELA 4).

O FIV subtipo A, foi utilizado como ferramenta para comparar as respostas geradas por este vírus com o vetor vacinal. Para a realização desses ensaios o FIV-A, presente no plasmídeo pFIV-14-Petaluma, foi clonado em bactérias que tiveram a verificação da incorporação do plasmídeo testada por PCR (FIGURA 13) e restrição enzimática (FIGURA 14). Células CRFK foram transfectadas com o plasmídeo e a produção de proteínas virais foi verificada por Western Blot (FIGURA 15).

Para avaliar a resposta celular foram utilizados peptídeos sintéticos. A escolha de epítomos imunogênicos presentes na região V1-V3 do envelope do FIV foi baseada nas plataformas HLA *Peptide Binding Predictions* e *Immune Epitope Database and Analysis Resource*. Ao todo foram escolhidos 8 peptídeos que foram sintetizados pela empresa GENOME-Brasil (TABELA 2). A avaliação da ativação de esplenócitos de animais inoculados com MVA/FIV por meio

destes peptídeos se deu pela avaliação de produção de interferon gama, este resultado foi comparado com o de animais inoculados com MVA selvagem (FIGURA 16). Estes peptídeos sintéticos da região V1-V3 do FIV não são encontrados na estrutura dos Vaccinia, por este motivo, foi esperado uma resposta específica. Embora o ensaio detectou a estimulação do peptídeo 1 (IALQCNSTKNLTFA) em esplenócitos de camundongos vacinados com MVA selvagem, essa detecção foi muito abaixo quando comparada com o controle positivo, representado pelo PMA/Ionomicina. Isto pode indicar uma produção basal de interferon, não representando uma estimulação. O peptídeo 3 (SMVYLLIGYL) e o peptídeo 6 (VWRLPPL) apresentaram melhores resultados. Devido a isto, o peptídeo 3 foi utilizado em experimentos posteriores.

Posteriormente foi avaliada a proliferação celular (FIGURA 17-A), onde os resultados indicaram que embora seja possível observar uma diferença significativa entre o controle positivo (PMA/Ionomicina) com o controle negativo (meio de cultura RPMI), não foi possível observar diferença estatística entre o peptídeo 3 e o controle negativo. Ao analisar as respostas ao peptídeo 3 entre si (FIGURA 17-B), é possível observar que a comparação do grupo MVA/FIV com o grupo *Mock*, apresenta uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Embora o peptídeo 3 não faça parte do proteoma do MVA, a partir destes resultados não é possível observar diferença estatística entre o grupo MVA selvagem e MVA/FIV

Segundo BACKERT (2015), mesmo com a utilização da bioinformática como ferramenta para a predição de epitopos para linfócitos T, isso não é suficiente para garantir o reconhecimento pelo sistema imune do peptídeo sintetizado. Considerando a inexistência de trabalhos na prévios que utilizem o peptídeo SMVYLLIGYL (peptídeo 3) como estímulo na proliferação celular, estes resultados levam a duas hipóteses. A primeira consiste em que o peptídeo não é um bom estimulante para a proliferação celular embora gere uma boa resposta humoral (descrita posteriormente). A segunda hipótese refere-se à falha na técnica empregada ou interpretação dos dados computados. Essas desvantagens do ensaio de proliferação celular utilizando CFSE já foram descritas anteriormente (BRACKS 2010).



Logo, a avaliação da resposta humoral foi feita por meio de ELISA e Wester Blot.

Os resultados do ELISA (FIGURA 18) corroboram com os resultados obtidos no ensaio de detecção de produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ , o qual demonstraram a especificidade da resposta gerada pelo peptídeo 3. No ELISA foi possível observar que o peptídeo 3 não gerou resposta detectável no grupo *Mock*, e embora tenha detectado uma resposta inferior a 0,1 de absorbância no grupo MVA selvagem, isto não desqualifica a especificidade do peptídeo pois foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre o grupo MVA selvagem e MVA/FIV

Os resultados obtidos a partir dos Wester Blot realizados, mostraram que o pool de soro de gatos naturalmente infectado foi capaz de reconhecer as proteínas recombinantes produzidas pelo vetor vacinal (FIGURA 19). Além disso, a vacina gerou resposta específica contra FIV subtipo B, uma vez que o soro de animais inoculados com a vacina experimental, não foi capaz de reconhecer o FIV subtipo A (FIGURA 20).

Ainda, cabe destacar que a vacina Fel-O-Vax®, comercializada contra FIV subtipo A e D, leva na sua formulação a partícula do FIV inativado. Esta composição, faz com que o animal vacinado seja detectado como positivo para FIV, mesmo ele nunca ter tido contato com o vírus. O protótipo vacinal proposto no presente trabalho, apresenta entre suas vantagens a capacidade de imunizar o animal sem produzir falsa positividade no diagnóstico para FIV.

## **CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a construção dos vírus MVA/FIV foi bastante eficiente uma vez que expressam claramente a proteína recombinante FIV/ENV<sup>P</sup>. Não obstante, para avaliá-los como candidatos vacinais contra o FIV subtipo B, foi necessário demonstrar sua eficiência em estimular tanto uma resposta humoral como uma resposta celular específicas.

Os testes realizados neste trabalho sugerem que o vírus vacinal apresentou foi capaz de induzir resposta humoral em camundongos, já que o soro destes animais reconhece a proteína ENV<sup>P</sup>. Além disso, as proteínas recombinantes produzidas pelo vetor MVA são reconhecidas pelo soro de gatos naturalmente infectados, o que denota a correta conformação imunogênica das proteínas recombinantes. Adicionalmente, demonstrou-se uma resposta humoral específica para o subtipo B, pois o soro de camundongos inoculados com o vírus vacinal não reconheceram o FIV subtipo A. A avaliação da resposta celular sugere uma ativação específica apoiada pela análise estatística dos dados. No entanto, deve-se reconhecer que análises mais minuciosas ainda são necessárias para se confirmar a intensidade de uma possível resposta celular induzida pela vacinação.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que temos um candidato vacinal promissor contra a síndrome da imunodeficiência felina provocada pelo FIV subtipo B.

Este trabalho tem ainda como perspectivas A avaliação do peptídeo 3 como ferramenta de diagnóstico contra FIV subtipo B em trabalhos posteriores. Além da perspectiva de um novo ensaio para verificar a resposta celular. Obviamente, ressalta-se que todas as análises apresentadas nesta tese foram feitas em modelo murinho de imunização. Estes animais não são modelos para a infecção pelo vírus FIV, de forma que experimentos em espécie alvo são necessários para se avaliar com precisão a adequação ou não do candidato vacinal gerado por nós.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS

ABINPET- Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação. Disponível em: <http://abinpet.org.br/site/> Acesso em 01/03/2016.

ALCAMI, J.; Ciclo Replicativo del VIH: Dianas Terapéuticas Consolidadas y Dianas Potenciales. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v 26, n 12, p 3-10, 2008.

ALVES, F., MAZUR, C. RAJÃO, D., DEL PUERTO, H. L., BRAZ, G. F., VIEIRA, F. O., LEITE, R. C., MARTINS, A. S. & REIS, J. K. P. Indirect Western Blot in the diagnosis of feline immunodeficiency virus. *Revista da FZVA.* V. 19, n.1, p. 55-60, 2013

ANDRADE, L. A. F. Geração de um vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) expressando a região variável 1-3 da proteína do envelope do vírus da imunodeficiência felina (FIV). **Dissertação de Mestrado em Microbiologia.** Universidade Federal de Minas Gerais, Fevereiro de 2012.

BENDINELLI, M., PISTELLO, M., LOMBARDI, S., POLLI, A., GARZELLI, C., MATTEUCCI, D., NELLI-CECCHERINI, L., MALVALDI, G., TOZZINI, F. Feline immunodeficiency vírus: na interesting model for AIDS studies and a important cat pathogen. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 8, n.1, p.87- 112, 1995.

BIDGOOD, S. R., MERCER, J. Cloak and dagger: Alternative immune evasion and modulation strategies of Poxvirus. **Viruses.** v. 7, p. 4800-4825, 2015.

BLANCHARD, T. J., ALCAMI, A., PANAYIOTA, A., SMITH, G. L. Modified vaccinia vírus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. **Journal of General Virology.** v.79, p.1159- 1167, 1998.

BUCCI, J., GEBHARD, D., CHILDERS, T., ENGLISH, R., TOMPKINS, M., TOMPKINS, W. The CD8+ phenotype mediating antiviral activity in FIV-infected cats is characterized by reduced surface expression of the CD8 beta chain. **J. Infect. Dis.** v. 178, p. 968- 977, 1998.

BULLER, R. M.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. **Microbiol Rev**, v.55, n.1, p. 80- 122,1991.

BURMEISTER, T.; SCHWARTZ, S.; THIEL, E. A PCR primer system for detecting oncoretroviruses based on conserved DNA sequence motifs of animal retroviruses and its application to human leukemia and lymphomas. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2205-2213, 2001.

BURKARAD, M. J., DEAN, G. A. Transmission and Immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. **Current HIV Research**. v. 1, n. 1, p. 15-29, 2003.

CALDAS, A. P. F., LEAL, E. S., SILVA, E. F. A., RAVAZZOLO, A. P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica da reação em cadeia da polimerase. **Pesq. Vet. Bras**. v.20, n. 1., p. 20- 25, 2000.

CAXITO, F. A., COELO, F. M., OLIVEIRA, M. E., RESENDE, M. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from state of Minas Gerais, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.58, n.6, p. 1222-1225, 2006.

CAXITO, F.A.; MAGALHÃES-COELHO, F.; PINTO, F.F. et al. Study of feline immunodeficiency virus (FIV) in Minas Gerais by nested PCR-RFLP analysis of the gag gene. In: **NATIONAL MEETING OF VIROLOGY**, 14., 2003, Florianópolis. *Anais...*, Florianópolis, 2003. p. 209.

Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**. v.16, n.22, p.10881-10890, 1988.

COTTINGHAM, M. G., ANDERSEN, R. F., SPENCER, A. J., SAURYA, S., FURZE, J., HILL, A. V. S., GILBERT, S. C. Recombination-Mediated Genetic Engineering of a Bacterial Artificial Chromosome Clone of Modified Vaccinia vírus Ankara (MVA). **PloS ONE**. v.3, n. 2, p.1- 9, 2008.

COURCHAMP, F., PONTIER, D. Feline immunodeficiency vírus: na epidemiological review. **Comptes rendus de l'Académie dès sciences**. v. 317, n. 12, p.1123- 1134, 1994.

DAMON, I.K. Poxviruses. IN: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. P.2947- 2975.

DRISCOL, C. A., MACDONALD, D. W., O'BRIEN, S. J. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. **PNAS**. v. 106, supp.1, p. 9971-9978, 2009

DUARTE, A., & TAVARES, L. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**. v.114, p.25- 33, 2006.

DUARTE, A., MARQUES, M. I, TAVARES, L., FEVEREIRO, M. Phylogenetic analysis of Five portuguese strain of FIV. **Arch. Virol**. v. 147, p. 1061- 1070, 2002.

DUNHAM, S.P, FLYANN, J.N., RIGBY, M.A., McDONALD, J.B., CNNON, C., GOLDER, M.C., HANLON, L., HARBOUR, D.A., MACKAY, N.A., SPIBEY, N., JARRET, O., NEIL, J.C. Protection against feline immunodeficiency virus using replication defective proviral DNA vaccines with feline interleukin-12 and -18. **Vaccine**, v.20, p.1482-1496, 2002.

ELDER, J. H., SUNDSTORM, M., ROZIERES, S., PARSEVAL, A., GRANT, C. K., LIN, Y. C. Molecular mechanisms of FIV infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 123, p. 3- 13, 2008.

ELDER, J. H., LIN, Y., FINK, E., GRANT, C. K., Feline Immunodeficiency Virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: Parallels with HIV. **Curr HIV Res**. v. 8, n. 1, p. 73-80, 2010.

ERTL, H. C. J., Viral vectors as vaccine carriers. **Current opinion in virology**. v. 17, p. 1-8, 2016.

FENNER, F.; WITTEK, R.; DUMBELL, K.R. The Orthopoxvirus. IN: Academic Press, San Diego, 1989.

FLETCHER, N. F., BRAYDEN, D. J., BRANKIN, B., CALLANAN, J. J. Feline immunodeficiency virus infection: A valuable model to study HIV- associated encephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.123, p.134-137, 2008.

FREED, E. O. Hiv-1 Gag Proteins Diverse Functions In The Virus Life Cycle. **Virology**. v. 251, pg. 1- 15, 1998.

FREED, E. O. Hiv-1 Replication. Somatic cell and molecular genetics. **Virology.** v. 26, p. 13-3, 2002.

FUNG-MARTEL, J. C., GUMMOW B., BURGESS, G., FENTON E., SQUIRES, R. A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. **Journal of Feline Medicine and Surgery.** v. 15, n. 12, p. 1070-1078, 2013.

GEBHARD, D., DOW, J., CHILDERS, T., ALVELO, J., TOMPKINS, M., TOMPKINS, W. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) suppressor function in the circulation of FIV-infected cats. **J. Infect. Dis.** v. 180, p. 1503- 1513. 1999.

GEMENIANO, M. C.; SAWAI, E. T.; LEUTENEGGER, C. M.; SPARGER, E. E. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Is Required for Virus Particle Formation and Virus Infectivity. **Journal of Virology.** v.77, n.16, p. 8819- 883, 2003.

GILBERT, S. C. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. **Vaccine.** v. 31, p. 4241-4246, 2013.

GREENE, G.E. Clinical microbiology and Infectious diseases of the dog and cat. **Saunders Company.** 1990

HARTMANN, K., GRIESSMAYR, P., SCHULZ, B., GREENE, C.E., VIDYASHANKAR, A.N., JARRETT, O., EGBERINK, H.F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery,** v. 9, p. 439-445, 2007.

HOOD, S.F., THOMPSON, E. M., AKARONU, N. O., MILLER, M., M., & FOGLE, J. E., Monocyte-Derived dendritic cells from Feline immunodeficiency virus positive cats are productively infected and maintain CD8<sup>+</sup> T cell stimulatory capacity. **International Journal of Virology and AIDS.** v. 2, n. 1, p 1-6, 2015

HOPPER, C. ., CREPPS, P. J., HOWARD, P. E., HARBOUR, D. A., GRUFFYDD-JONES, T. J. The epidemiology of the feline immunodeficiency virus infection in cats in the United Kingdom. **Proc. Soc. Vet. Epid. Prev. Med.** v.17, n.19, p.67-74, 1991.



HORZINEK, M. C., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HARTMANN, K., HOSIE, M. J., LLORET, A., LUTZ, H., MARSILIO, F., MÖSTL, K., PENNISI, M. G., RADFORD, A. D., THIRY, ETIENNE & TRUYEN, U. ABCD update of the 2009 guidelines on prevention and management of feline infectious diseases. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 15, p. 530-539, 2013.

HOSIE M. J., BEATTY, J. A., Vaccine protection against feline immunodeficiency virus: setting the challenge. **Austrian Veterinary Journal**. v. 85, n. 1, p. 5- 12, 2007.

HOSIE, M. J., ADDIE, D., BELÁK, S., BARALON-BOUCRAUT, C., EGBERINK, H., TADEUSZ, F., GRUFFYDD-JONES, T., HARTANN, K., LLORET, A., LUTZ, H., MARSILIO, F., PENNISI, M. G., RADFORD, A. D., THIRY, E., TRUYEN, U., HORZINEK, M. C. Feline immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 11, p.575- 584, 2009.

HU, Q., FINK, E., HONG, Y., WANG, C., GRANT, C. K., ELDER, J. H. Fine definition of the CXCR4-Binding region on the V3 loop of Feline Immunodeficiency Virus surface glycoprotein. **PLoS ONE**, v.5, ed. 5, n. 10689, 2010.

HUANG, C.; CONLEE, D.; GILL, M. & CHU, H-J. Dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine provides 12 months of protective immunity against heterologous challenge. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 12, p. 451- 457, 2010.

HUISMAN, W., MARTINA, B. E. E., RIMMELZWAAN, G. F., GRUTERS, R. A., OSTERHAUS, A. D. M. E. Vaccine-induced enhancement of viral infections. **Vaccine**. v.27, ed. 4, p.505- 5012, 2008B.

HUISMAN, W., SCHRAUWEN, E. J. A., TIJHAAR, E., SÜZER, Y, PAS, S. D., AMERONGEN, G. V., SUTTER, G., RIMMELZWAAN, G. F.& OSTERHAUS, A. D. M. E. Evaluation of vaccination strategies against infection with feline immunodeficiency virus (FIV) based on recombinant viral vectors expressing FIV **Rev and OrfA**. **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 126, p. 332-338, 2008A.

INOSHIMA, Y., MIYAZAWA, T., MIKAMI, T. In vivo functions of the auxiliary genes and regulatory elements of feline immunodeficiency virus. **Veterinary Microbiology**. v. 60, p. 141- 153, 1998.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES 2013– ICTV. Disponível em :< <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Aceso em 12/10/2014.

JENNINGS, L. B, R.N., C.S., M.S.N. Potential Benefits of pet ownership in health promotion. **Journal of Holistic Nursing**. v.15, n. 4, p.358-372 1997.

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

KATZ, R. A & SKALKA, A. M.; Generation of Diversit in Retrovírus. **Annu. Rev. Genet**. v.24, pg.409-445, 1990.

KRAASE, M., SLOAN, R., KLEIN, D., LOGAN, N., McMONAGLE, L., BIEK, R., WILLETT, B. J. & HOSIE, M. Feline Immunodeficiency Virus env gene evolution in experimentally infected cats. **Veterinary immunology and immunopathology**. v.134, p. 96-106, 2010.

LARA, V. M., TANIWAKI, S. A., JR, J. P. A. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras**. v.27, n.11, p.467- 470, 2007.

LECOLLINET, S. & RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The Road not taken. **Comparative immunology, microbiology & infectious disease**. v. 31, p. 167-190, 2008.

LEVIN, A., HAYOUKA, Z., WERNER-BRACK, R., VOLSKY, D. J., FRIEDLER, A., LOYTER, A. Novel regulation HIV-1 replication and pathogenicity: Rev inhibition of integration. **Protein Engineering, Desig & Selection**. v. 22, n. 12, p. 753- 763, 2009.

LOMBARDI, S., GARZELLI, C., LA ROSA, C., ZACCARO, L., SPECTER, S., MALVALDI, G., TOZZINI, F., ESPOSITO, F., BENDINELLI, M. Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the feline immunodeficiency virus envelope. **Journal of Virology**. v. 67, n. 8, p. 4742- 4749, 1993.

LUTZ, H., ADDIE, D., BELÀK, S., BOUCRAUT-BARALON, EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HARTMANN, K., HOSIE, M. J., LLORET, A., MARSILIO, F., PENNISI, M. G., RADFORD, A. D., THYRY, E., TRUYEN U. & HORZINEK, M. C. Feline Leukemia ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 11, p. 565-574, 2009

LUTZ, H., LEHMANN, R., WINKLER, G., KOTTWITZ, B., DITTMER, A., WOLFENSBERGER, C, ARNOLD, P. Das feline immunschwächevirus in der schweiz: klinik und epiemiologie im vergleich MIT dem leuämie- und dem coronavirus. Shwiz. **Arch. Tierheilkd.** v. 132, p. 217- 225, 1990.

MAGNUS, S., WHITE, R. L., PARSEVAL, A., SASTRY, K. J., MORRIS, G., GRANT, C. K., ELDER, J. H. Mapping of the CXCR4 binding site within variable region 3 of the feline immunodeficient virus surface glycoprotein. **Journal of Virology**. v.82, n.18, p.9134- 9142, 2008.

MASTRANGELO, M.J.; EISENLOHR, L.C.; GOMELLA, L.; LATTIME, E.C. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *J Clin Invest*, v. 105, n. 8, p. 1031-1034, 2000.

McFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p.201- 213, 2005.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v.66, n. 2, p.183-193, aug. 2006.

MOSS, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 21, p. 11341-11348, 1996.

MOSS, B. Poxviridae: The viruses and their replication. IN: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. p. 2905-2945.

NAKAMURA, K. . SUZUKI, Y, . IKEO, K, . IKEDA, Y., E. SATO, E., NGUYEN, N. T. P., GOJOBORI, T., MIKAMI, T., MIYAZAWA, T. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. **Archives of Virology**. v.148, n.4, p.783- 791, 2003.

OMORI, M., PU, R., TANABE, T., HOU, W., COLEMAN, J. K., ARAI, M., YAMAMOTO, J. K. Cellular immune responses to feline immunodeficiency virus (FIV) induced by dual subtype FIV vaccine. **Vaccine**. v.23, p.386- 398, 2004.

PEDERSEN, N. C., HO, E. W., BROWN, M. L., YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with AIDS-like syndrome. **Science**. v. 235, p. 790- 793, 1987.

PHADKE AP, DE LA CONCHA-BERMEJILLO A, WOLF AM, ANDERSEN PR, BALADANDAYUTHAPANI V, COLLISSON EW. Pathogenesis of a Texas feline immunodeficiency virus isolate: an emerging subtype of clade B. **Vet Microbiol**. v. 15, n.115, p.64- 76, 2006.

PU, R., COLEMAN, J., COISMAN, J., SATO, E., TANABE, T., ARAI, M. & YAMAMOTO, J. Dual-subtype FIV vaccine (Fel-O-Vax® FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 7, p. 65- 70, 2005.

QIAGEN, The QIAexpressionist – A Handbook for high-level expressions and purification of 6xHis-Tagged proteins. **QIAGEN**. 03., 2001.

Quah, B. J., H. S. Warren, *et al.* Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. Nat Protoc, v.2, n.9, p.2049-56. 2007.

RICHARDSON, J., BROCHE, S., BAUD, S., LESTE-LASSERRE, T., FEMENIA, F., LEVY, D. Lymphoid activation: a confounding factor in AIDS vaccine development? **J. Gen. Virol**. v. 83, n. 10, p.2515- 2521, 2002.

RIO, D.C., ARES JR., M., HANNON, G.J, NILSEN, T.W. RNA: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Protocols. 2011

ROCHA, A.L.; PECON-SLATTERY, J.; O'BRIEN, S.J. Genomically intact endogenous feline leukemia viruses of recent origin. **Journal of Virology**, v. 78, p. 4370-4375, 2004.

SAMMAN, A., LOGAN, N., McMONAGLE, E. L., ISHIDA, T., MOCHIZUKI, M., WILLET, B. J., HOSIE, M. J. Neutralization of feline immunodeficiency virus by antibodies targeting the V5 loop of Env. **Journal of general virology**. v.91, p.242- 249, 2010.

SAMMAN, A., LOGAN, N., McMONAGLE, E. L., ISHIDA, T., MOCHIZUKI, M., WILLET, B. J., HOSIE, M. J. Neutralization of feline immunodeficiency virus by antibodies targeting the V5 loop of Env. **Journal of general virology**. v.91, p.242- 249, 2010.

SERPER, J. Beneficial effects of pet ownership on some aspects of human health and behaviour. **Journal of the royal society of medicine**. v. 84, p. 717-720, 1991.

SIEBELINK, K. H. J., HUISMAN, W., KARLAS, J. A., RIMMELZWAAN, G. F., BOSCH, M. & OSTERHAUS, A. D. M. E. Neutralization of Feline Immunodeficiency Virus by Polyclonal feline antibody: Simultaneous Involvement of hypervariable regions 4 and 5 of the surface glycoprotein. **Journal of virology**. v. 69, n. 8, p. 5124-5127, 1995

Souza, A.P.; Haut, L.; Reyes-Sandoval, A.; Pinto, A.R. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 4, p.509-522, 2005.

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

SPARGER, E. E. Current thoughts of feline immunodeficiency virus infection. **Vet. Clin. North am small anim**. v. 23, n. 1, p.173- 191, 1993.

STOKER, M., MACPHERSON, I. Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BH21 and its derivatives. **Nature**. v. 203, p. 1355-1357, 1964.

TEIXEIRA, B. M., RAJÃO, D. S., HADDAD, J. P. A., LEITE, R. C., REIS J. K. P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.59, n.4, p.939-942, 2007.

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

TOMONAGA, K. & MIKAMI, T., Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. **Journal of General Virology**. v. 77, p. 1611- 1621, 1996.

TOMPKINS, M. B. & TOMPKINS, W. A. Lentivirus-induced immune dysregulation. **Veterinary immunology na immunopathology**. v.123, p.44- 55, 2008.

TROYLER, J. L., PECON-SLATTERY, J., ROELKE, M. E., JOHNSON. W., VONDE-WOUNDE, 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. Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae. **J. virol**. v. 79, p.8282- 8294, 2005.

UHL. E. W., MARTIN, M., COLEMAN, J. K. & YAMAMOTO, J. K. Advances in FIV vaccine technology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 123, p. 65 – 80, 2008.

WESTMAN, M. E., MALIK, R., HALL, E., HARRIS, M., NORRIS, J. M. The protective rate of the feline Immunodeficiency Virus vaccine: An Australian field study. **Vaccine**. v. 34, p. 4752-4758, 2016.

WILLETT, B. J., HOSIE, M. J., CALLANAN, J. J., NEIL, J. C., JARRETT, O. Infection with feline immunodeficiency virus is followed by the rapid expansion of a CD8+ lymphocyte subset. **Immunology**. v. 78, p. 1-6, 1993.

YAMAMOTO, J. K., SPARGER, E., HO, E. W., ANERSEN, P. H., O'CONNOR, T. P., MANDELL, C. P., LOWESTINE, L., PEERSEN, N. C. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **Am J. Vet. Res.** v. 49, p.1246- 1258, 1988.