



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (UnB)
Laboratório de Bioprospecção e Laboratório de Farmacologia Molecular
Pós Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina.

Sócrates Souza Ornelas

**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV) EM CÉLULAS
CRONICAMENTE INFECTADAS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE RNA DE
INTERFERÊNCIA.**

Brasília – DF
2012

Sócrates Souza Ornelas

**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV) EM
CÉLULAS CRONICAMENTE INFECTADAS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE RNA
DE INTERFERÊNCIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Francisco de Assis R. Neves

Brasília – DF
2012

Sócrates Souza Ornelas

**INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV) EM
CÉLULAS CRONICAMENTE INFECTADAS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE RNA
DE INTERFERÊNCIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (UnB), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Francisco de Assis R. Neves

Francisco de Assis Rocha Neves (Orientador) – UnB

Dr. Bergmann Morais Ribeiro – UnB

Dra. Simone Perecmanis – UnB

Dr. Octávio Luiz Franco – UCB

Dra. Paula Andreia Silva – UnB

Dr. Luiz Isamu Kanzaki (Suplente) – UnB

Brasília – DF
2012

A toda minha família, que me acompanha em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, em especial, que possibilitaram de todas as formas a realização deste trabalho. Aos meus irmãos e amigos, que por muitas vezes não entenderam uma possível ausência e falta de convivência em vários momentos. Aos meus alunos, que também sofreram com minha ausência durante a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, fica aqui expressa a minha gratidão, especialmente:

Ao Professor Luis Kanzaki, pela orientação, pelo aprendizado e apoio em todos os momentos necessários.

Aos meus colegas de classe, pela rica troca de experiências.

Aos alunos, professores e funcionários do laboratório de Farmacologia Molecular e do laboratório de Bioprospecção, pelo suporte técnico e colaboração em vários momentos deste trabalho.

Ao meu amigo Pedro Augusto do Nascimento, que sempre me motivou e compreendeu minhas ausências no MÉSON-PI.

A minha querida amiga Isabela Gennari, que me ajudou com a correção desta tese.

Ao meu nobre amigo Gustavo Barra, sempre solícito e disposto a me ajudar a finalizar esta etapa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

RESUMO

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV), isolado inicialmente em 1964, corresponde a um retrovírus patogênico, endêmico entre gatos domésticos, que ocasiona uma séria doença entre estes animais. O mecanismo de interferência por RNA, RNA de interferência (RNAi) é um processo no qual moléculas de ácido ribonucléico (RNAs) de dupla fita (dsRNA) induzem a degradação pós-transcricional do RNA mensageiro homólogo, de forma sequência-específica. Até o presente, o RNAi tem se apresentado como ferramenta molecular em potencial para estratégias de tratamento de várias doenças por meio da inibição da expressão de proteínas ou peptídeos desejados. Este estudo se empenhou na aplicação da tecnologia do RNAi na inibição da replicação do FeLV. Examinou-se o efeito da transferência e expressão de pequenos fragmentos de RNA com dobramento na extremidade (shRNA) contra a expressão da proteína p27 e a replicação de FeLV em linhagem de células T cronicamente infectadas com FeLV (3201-EECC), via vetores de expressão de RNAi. A proteína p27 é produzida via expressão do gene *gag* de FeLV, sendo componente molecular do nucleocapsídeo viral. Esta proteína pode ser encontrada em grande abundância em células sanguíneas infectadas ou de forma solúvel no plasma e soro de gatos virêmicos. Três shRNAs homólogos ao gene *gag* de FeLV foram sintetizados, clonados e transfectados em linhagens de células fibroblásticas felinas (CrFK), expressando FeLV. A expressão desses shRNAs conseguiram diminuir de forma eficiente a expressão da proteína p27 e, conseqüentemente, reduziram a replicação viral em linhagem de célula T cronicamente infectada (3201-EECC). A expressão de shRNA contra o gene *gag* de FeLV mostrou redução dos níveis de p27 e da replicação viral nas linhagens celulares, 3201-EECC e CrFK. Esses resultados fornecem informações importantes para futuro desenvolvimento de estratégias de terapia gênica no controle das infecções por FeLV e infecções retrovirais relacionadas.

Palavras-chave: FeLV, RNAi, *gag*, p27, gatos, shRNA.

ABSTRACT

Feline Leukemia Virus (FeLV) is a pathogenic retrovirus endemic among domestic cats remaining an important disease since its discovery in 1964. RNA interference (RNAi) is a process in which double-stranded RNA induces the post-transcriptional sequence-specific degradation of homologous messenger RNA. At present, RNAi technology regarded as a potential strategy for the treatment of various diseases as it can be used to inhibit the expression of desired peptides/proteins. The present study aimed to apply the RNAi technology to inhibit the replication of FeLV. We examined the effect of vector-mediated transfer and expression of FeLV specific short hairpin RNA (shRNA) against p27 protein expression and replication of FeLV in a feline T-cell line chronically infected with FeLV (3201-EECC). Three shRNA homologous to the FeLV *gag* gene synthesized, cloned and transfected into a feline fibroblastic cell line (CrFK) expressing FeLV, efficiently reduced FeLV p27 protein expression, consequently decreased and inhibited the viral replication in a chronically FeLV infected feline T-cell line (3201-EECC). The p27 protein is a structural component of the inner viral core. This protein can be found in great abundance in infected blood cells and in soluble form in plasma and serum of viremic cats. The expression of shRNA against FeLV *gag* gene showed to markedly lower p27 levels and viral replication in both cell lines, 3201-EECC and CrFK. These results provide useful information to pave the road for the development of gene therapy strategy to control FeLV and related pathogenic retroviruses infection in the future.

Keywords: RNA interference; FeLV; *gag*; p27; cat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogênese da infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV).....	21
Figura 2. Estrutura do genoma do provírus de FeLV..	26
Figura 3. Desenho esquemático da estrutura de FeLV.....	27
Figura 4. Descrição dos subtipos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV), tropismos e prevalência em gatos infectados..	28
Figura 5. Ciclo do Vírus da Leucemia Felina (FeLV).....	29
Figura 6. O processo de RNA de interferência e sua manipulação.....	37
Figura 7. Clonagem no vetor pSUPER.....	46
Figura 8. Validação do sistema de expressão de shRNA em células de felinos..	52
Figura 9. Immunoblotting da inibição da expressão da proteína p27.....	53
Figura 10. Densitometria do Immunoblotting da inibição da expressão da proteína p27.....	54
Figura 11. Efeito da expressão de shRNA no brotamento de FeLV em células CrFK..	55
Figura 12. Efeito da transferência e expressão de shRNA contra FeLV, via vetor lentiviral, na replicação de FeLV em células 3201-EECC.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Neuropatias decorrentes da infecção por FeLV.	24
Tabela 2. Função e localização das proteínas do FeLV.	26
Tabela 3. Plasmídeos e seus produtos.	45
Tabela 4. Sequências alvo para o gene <i>gag</i> de FeLV e suas posições correspondentes no genoma de FeLV-A.	46

LISTA DE SIGLAS

- AMD – degeneração macular relacionada à idade
- AZT – azidotimidina
- CrFK – Células fibroblásticas de felino
- DGCR 8 - Proteína ligante de RNA dupla fita
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- dsRNA – RNA de dupla fita
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- enFeLV – Vírus da Leucemia Felina endógeno
- env – Gene envelope
- FeLV – Vírus da Leucemia Felina
- FeSV – Vírus do sarcoma felino
- FIV – Vírus da imunodeficiência felina
- gag* – gene do grupo de antígenos de FeLV
- GFP – Proteína verde fluorescente
- HBV – Vírus da Hepatite B
- HIV – Vírus da imunodeficiência Humana
- HPV – Vírus do Papiloma Humano
- miRNA - microRNAs
- MuLV – Vírus da Leucemia Murina
- pol* – Gene da polimerase
- RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
- RNAi – RNA de interferência
- RNA_m – RNA mensageiro
- SAV – Sarcoma associado com vacina
- shRNA – Pequeno RNA com dobramento em uma das extremidades
- siRNA – Pequenos RNAs interferentes
- SIV – Vírus da Imunodeficiência dos Símios
- SNC – Sistema Nervoso Central
- VEGF – Fatores de crescimento vascular endotelial
- VL – Vetores Lentivirais
- VN – Neutralização viral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Justificativa.....	15
1.2. Objetivos	15
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. O Vírus da Leucemia Felina (FeLV)	17
2.2. Epidemiologia.....	17
2.3. Viabilidade de FeLV	19
2.4. Patogênese	19
2.4.1. <i>Imunidade</i>	19
2.4.1.1. Imunidade passiva	19
2.4.1.2. Resposta imunológica ativa contra FeLV	20
2.5. Sinais Clínicos.....	20
2.5.1. Imunossupressão.....	20
2.5.2. Anemia	22
2.5.3. Linfoma	23
2.5.4. <i>Outras doenças relacionadas com FeLV</i>	24
2.6. O genoma de FeLV	25
2.7. O ciclo de replicação de FeLV.....	29
2.8. Tratamento.....	30
2.8.1. <i>Vacinas e suas limitações</i>	30
2.8.2. <i>Drogas antivirais e novas oportunidades de tratamento</i>	32
2.9. RNA de interferência.....	34
2.9.1. <i>Potenciais terapêuticos para RNA de interferência</i>	38
2.9.2. <i>Inserção celular e transcrição do RNAi</i>	40
2.9.3. <i>Expressão de shRNA via vetores virais</i>	41
2.9.4. <i>Vetores Lentivirais</i>	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Células	44

3.2. Plasmídeos	44
3.3. Transfecção de células CrFK.....	47
3.4. Análise por Immunoblotting	47
3.5. Preparação de estoque viral e transdução de células.....	48
3.6. Ensaio de transcriptase reversa (RT).....	48
3.7. Citometria de fluxo	49
3.8. Microscopia de fluorescência.....	49
3.9. Análises estatísticas.....	49
4. RESULTADOS	51
4.1. Confirmação da inibição da expressão de GFP em células CrFK via expressão de shRNA	51
4.2. Inibição da expressão da proteína p27 em células CrFK transfectadas	53
4.3. Efeito da expressão de shRNA contra a replicação de FeLV em células CrFK transfectadas	54
4.4. Efeito da expressão de shRNA específicos para FeLV, mediada por vetor lentiviral, na replicação viral em células 3201-EECC	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE: MANUSCRITO.....	77

1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV), desde sua descoberta, tem sido relacionado com diversas desordens em felinos, desencadeando verdadeira síndrome, que leva diversos animais a morte anualmente. O uso de RNA de interferência (RNAi) no controle de infecções virais já está sendo utilizado em estudos experimentais, com certo sucesso.

Após mais de cinco décadas de sua descoberta, FeLV continua sendo um dos vírus mais importantes relacionado aos gatos domésticos (JARRETT *et al.*, 1964). A transmissão desse vírus é favorecida em gatos criados em grupos, ou pelo uso comum de utensílios utilizados na alimentação. A replicação viral inicia-se na região da orofaringe do animal espalhando-se para linfonodos, sangue e outros tecidos. Após o estabelecimento da viremia no animal, o vírus é capaz de se espalhar rapidamente para outros tecidos, como o tecido hematopoiético de origem linfóide e mielóide, assim como células epiteliais (HARDY, 1981). Esta fase da infecção é crítica, pois – se o sistema imunológico consegue defender o organismo contra o vírus – pode criar uma resposta capaz de eliminar o vírus do hospedeiro. Cerca de 60% dos animais expostos a FeLV conseguem eliminar o vírus durante esta fase da infecção. Já 30% dos animais infectados não são capazes de vencer o vírus nessa etapa e acabam se transformando em animais persistentemente virêmicos (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

Os motivos que fazem um animal ser ou não persistentemente virêmico incluem a idade, o tempo de exposição, a dose viral, a rota de exposição e as doenças concomitantes que certamente influenciam no estabelecimento da viremia. Muitos gatos com infecção persistente morrem em 3 anos após desenvolvimento de doenças relacionadas com FeLV. Essas doenças incluem neoplasias, como linfomas e leucemias, além de doenças não neoplásicas, como anemia, enterites e infecções secundárias atribuídas à imunossupressão.

Ainda não está claro como a resposta imunológica pode eliminar o DNA proviral de animais infectados por FeLV que não são virêmicos e não apresentam antígenos por longo período de tempo. Alguns investigadores têm detectado o provírus de FeLV em gatos que não tiveram progresso na infecção (HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2001; HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2006, 2007), no entanto,

outros laboratórios têm reportado a não detecção de provírus em gatos do mesmo tipo, não progressivos (TANDON *et al.*, 2005).

Uma vez que o provírus está integrado nas células-tronco hematopoiéticas, a eliminação total da infecção parece ser improvável, devido ao fato de que a progênie dessas células também irá levar o DNA proviral. A significância clínica para gatos sem viremia com provírus positivo é incerta, no entanto, informações demonstram que a replicação viral não ocorre em muitos destes animais (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

A infecção por FeLV é um problema mundial, sem medidas de prevenção eficazes para gatos criados em grupos, levando à morte de muitos animais e, por consequência, gerando prejuízos econômicos e muitas vezes emocionais para os criadores desses animais. Atrelado a isto, condições precárias de existência desses animais contribuem para que as chances de sobrevivência dos animais seja reduzida frente a infecções virais como a de FeLV. Sendo assim, encontrar formas eficientes de prevenção, que sejam eficazes e que levem à redução significativa das infecções é de grande importância, particularmente para clínicos veterinários, servindo como modelo para tratamento e prevenção de retrovírus, onde podemos incluir a Síndrome da Imunodeficiência Humana (para a comunidade científica mundial).

A busca por novas técnicas de prevenção e tratamento contra infecções virais são importantes para aumentar as possibilidades de combate contra doenças infectocontagiosas como a decorrente pela infecção por FeLV. A técnica de RNA de interferência (RNAi) tem apresentado resultados promissores em diversos modelos virais como HIV e FIV, porém ainda não tinha sido testada para FeLV. Essa técnica consiste na degradação de RNA viral via introdução ou expressão de RNA de fita dupla com sequência complementar ao RNA viral, levando à redução da carga viral.

Sendo assim, este trabalho se empenhou em encontrar sequências nucleotídicas para futura terapia gênica, baseada no uso de vetores letivirais para inserção e expressão de RNAi contra FeLV *in vitro*, mostrando pela primeira vez que a redução da expressão da proteína p27 e da replicação viral é possível via expressão de RNAi em células de felinos infectadas por FeLV.

1.1. Justificativa

A ação crônica e letal por FeLV em felídeos infectados é mundialmente conhecida devido ao efeito devastador que esse vírus apresenta em determinadas condições de saúde do animal. Por ser um retrovírus, FeLV apresenta características semelhantes a outros retrovírus, como o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o Vírus da Imunodeficiência dos Símios (SIV), haja vista que o mecanismo básico de replicação é o mesmo para este grupo de vírus.

Pesquisas demonstram que apesar da diferença quanto ao mecanismo de replicação, tropismo de células e formas de infecção do hospedeiro, alguns mecanismos são fortemente preservados nos retrovírus, como a utilização da Transcriptase Reversa (RT) no processo de transcrição reversa. Baseando-se nesses fatos, podemos inferir que resultados satisfatórios com FeLV, além de contribuir de forma direta para o controle de infecções por esse vírus, pode levar ao aprofundamento do comportamento dos retrovírus em geral. É neste cenário que o uso de ferramentas de silenciamento gênico como o RNAi mostra-se valioso e promissor no estabelecimento de estratégias de terapia gênica, fazendo deste trabalho o ponto de partida no estudo da possibilidade de controle da infecção por FeLV via expressão de RNAi.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar o uso da tecnologia do RNA de interferência no controle da replicação retroviral do Vírus da Leucemia Felina em células infectadas de felinos.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Identificar sequências específicas contra FeLV para utilização em vetores para expressão de RNAi em células de felinos;
2. Testar o promotor H1 para expressão de RNAi em células de felinos;

3. Promover a inibição da expressão da proteína estrutural p27 em células de felino, co-transfectadas, através de plasmídeos para expressão de RNAi contra o gene *gag* de FeLV;
4. Desenvolver vetores de expressão de shRNA contra FeLV, utilizando-os em linhagens de células cronicamente infectadas por FeLV;
5. Analisar a produção de partículas virais de FeLV após co-transfecção de vetores para expressão de FeLV e sequências para RNAi;
6. Avaliar a promoção da inibição da replicação viral através da degradação de RNA viral por shRNA em células de felinos cronicamente infectadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

O vírus da Leucemia Felina (FeLV) é membro da família *Retroviridae*, compartilhando com o vírus da Leucemia murina (MLV) e o retrovírus da leucemia do macaco Gibão (GALV), o gênero *gamaretrovirus*. FeLV é patogênico para gatos domésticos e está envolvido em desordens proliferativas, degenerativas e imunossupressivas, tais como imunodeficiência adquirida, anemia e linfoma (EIDEN; TALIAFERRO, 2010; FISCHER, 2010; HARDY, 1981; WILLIAM; HARDY JR, 1993). FeLV foi isolado inicialmente em 1964 de linfomas obtidos de gatos enfermos (JARRETT *et al.*, 1964), visualizado por microscopia eletrônica, onde foi identificado um agente infeccioso que apresentava características parecidas com o Vírus da Leucemia Murina (MuLV). Estudos posteriores confirmaram FeLV como um retrovírus. Além dos gatos domésticos, FeLV também é capaz de infectar felinos como o *Felis silvestres* e os lincos europeus (*Felis lynx*) e ibéricos (*Lynx pardinus*). Desde sua descoberta, FeLV continua sendo descrito como importante agente infeccioso para gatos domésticos, sendo que a maior parte das infecções por FeLV ocorre após a exposição oronasal ao vírus, pela saliva de gatos virêmicos.

2.2. Epidemiologia

A infecção por FeLV é amplamente disseminada em populações de felinos em todo o globo terrestre. A incidência da infecção pode ser influenciada pela quantidade e densidade geográfica dos gatos nas regiões onde existe a presença do vírus. Há escassos dados epidemiológicos acerca da prevalência atual de FeLV em diferentes países. Em alguns países europeus, Estados Unidos da América (EUA) e Canadá, a prevalência da infecção por FeLV em gatos criados de forma individual se apresenta muito baixa, usualmente menor que 1% (HOSIE; ROBERTSON; JARRETT, 1989; LEVY *et al.*, 2006; LUTZ *et al.*, 1990). Em criatórios coletivos de gatos, sem medidas de prevenção para infecção por FeLV, acredita-se que a prevalência possa ser maior (do) que 70% (ROGERSON *et al.*, 1975).

Nos últimos 25 anos, a prevalência e o risco de infecção por FeLV na Europa e Estados Unidos da América tem diminuído, possivelmente devido à viabilidade de

novos testes, início de programas de remoção de animais infectados, e também a utilização de vacinas (“ABCD guidelines on Feline Leukaemia Virus”, 2007), porém no Brasil ainda não há dados que suportem tal processo.

A contenção da disseminação do FeLV é difícil, devido às rotas de transmissão, o tempo entre a infecção e o início dos sintomas e a possibilidade de animais latentes se tornarem virêmicos. Em suma, a exposição dos gatos ao FeLV, usualmente leva a uma de três vias estabelecidas, duas nas quais pode contribuir para que a doença se dissemine (SPARKES, 1997). A primeira via ocorre em 10% dos gatos infectados que se tornam latentes com viremia não detectável. Apesar destes gatos não serem fontes de infecção, podem se tornar virêmicos e subsequentemente liberar vírus no ambiente. A segunda via é representada por 40% dos gatos expostos ao FeLV, sendo caracterizada por viremia persistente e antigenemia. Estes gatos são cronicamente infectados e representam significativa fonte de liberação viral no ambiente. A terceira via incluem gatos que se tornam infectados com FeLV, porém são capazes de eliminar o vírus ao ponto de ser indetectável pelos métodos de análise clássicos: ELISA (“Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay”), PCR (Polymerase Chain Reaction), Imunofluorescência, etc. Aproximadamente 50% dos gatos expostos ao FeLV se encontram neste grupo, sendo que estes gatos não são considerados como reservatórios para a disseminação viral.

Gatos com viremia para FeLV são fontes de infecção. Os fatores de risco para infecção correspondem à idade jovem, alta densidade populacional e higiene precária. A infecção em gatas virêmicas prenhas geralmente leva a morte embrionária, natimorto ou o surgimento de filhotes virêmicos que desvanecem rapidamente. Já em gatas em estágio de latência viral, geralmente a transmissão não ocorre durante a prenhez, no entanto, alguns filhotes se tornam virêmicos após o nascimento (PACITTI *et al.*, 1986). Neste caso, a transmissão tem como fonte as glândulas mamárias, que apresentam o vírus permanecendo em estágio de latência, até a glândula mamária se desenvolver até o último período da prenhez. Filhotes mais novos são especialmente susceptíveis a infecção por FeLV, enquanto que com a idade vão se tornando cada vez mais resistentes a infecção (GRANT *et al.*, 1980; HOOVER *et al.*, 1976). Em todo caso, apesar de serem mais resistentes à infecção, ainda podem apresentar quadros infecciosos severos.

No Brasil, os dados disponíveis ainda são inconsistentes, apresentando estudos muitas vezes com números pequenos de animais e realizados em apenas algumas regiões específicas. De qualquer forma, alguns estudos tem demonstrado soroprevalência entre 0 e 17,5% para FeLV em populações de gatos de São Paulo e Rio de Janeiro (MENDES-DE-ALMEIDA *et al.*, 2004; GRAÇA; TEIXEIRA, 2002). Estudos mais recentes, em variadas regiões brasileiras tem demonstrado um índice de 6,04% de incidência positiva nos testes para o vírus da leucemia felina (STRICAGNOLO; JUNQUEIRA J., 2007). No entanto, no Brasil, pesquisas sobre a prevalência, tipos de vírus circulantes e a dinâmica do vírus em animais domésticos e selvagens são necessárias para que o panorama epidemiológico tenha informações mais confiáveis.

2.3. Viabilidade de FeLV

FeLV não sobrevive por muito tempo fora do hospedeiro, e é facilmente destruído por desinfetantes, sabão, aquecimento e ressecamento. Além disto, os gatos infectados podem transmitir o vírus por contato íntimo com a saliva através de mordidas, através da caixa de areia ou prato de comida usado por um gato infectado em ambientes coletivos e através do leite durante a amamentação (HARDY *et al.*, 1976; HOOVER; MULLINS, 1991; PACITTI *et al.*, 1986). Outras secreções como lágrimas, secreções respiratórias, urina e fezes também podem ser fontes de contaminação (ARJONA *et al.*, 2000). A transmissão também pode ocorrer a partir de gata infectada para seus filhotes, seja antes de nascer ou enquanto estiver amamentando (HARBOUR *et al.*, 2002). O vírus pode ser transmitido de forma iatrogênica via seringas e agulhas contaminadas, além de instrumentos cirúrgicos e transfusão sanguínea.

2.4. Patogênese

2.4.1. Imunidade

2.4.1.1. Imunidade passiva

Estudos têm demonstrado, de forma experimental, que filhotes susceptíveis podem ser protegidos da infecção por FeLV através da imunização passiva com altos títulos de anticorpos contra FeLV (HOOVER *et al.*, 1977), embora o tratamento com anticorpos monoclonais contra FeLV seja ineficiente, quando a viremia persistente se estabelece (WEIJER *et al.*, 1986).

2.4.1.2. Resposta imunológica ativa contra FeLV

A maioria dos gatos que superaram a viremia para FeLV apresentam elevados títulos de anticorpos para o vírus, quantificados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou soroneutralização viral (VN) (LUTZ *et al.*, 1980; RUSSELL; JARRETT, 1978); sendo que esses anticorpos são produzidos contra todos os antígenos virais (LUTZ *et al.*, 1980). Em muitos, porém não em todos, gatos que superaram a viremia, pode-se detectar a presença de anticorpos neutralizantes para o vírus (FLYNN *et al.*, 2002). Como nem todos os gatos desenvolvem altos títulos de anticorpos, é possível concluir que os linfócitos T Citotóxicos (CTLs) são também importantes para a imunidade contra FeLV (LUTZ *et al.*, 1980). De fato, foi demonstrado recentemente que CTLs específicos para FeLV aparecem antes dos anticorpos neutralizantes. A carga viral em gatos virêmicos pode ser reduzida de forma consistente com importante papel das CLTs na imunidade contra FeLV (FLYNN *et al.*, 2002).

2.5. Sinais Clínicos

A infecção por FeLV pode causar uma gama de variações quanto aos sinais clínicos. Os sinais mais comuns da doença são em decorrência da persistência da viremia de FeLV, sendo os principais sintomas a imunossupressão, a anemia e o linfoma (HARDY *et al.*, 1973, 1976) (Figura 1).

2.5.1. Imunossupressão

A supressão imunológica decorrente da infecção do FeLV é mais complexa e mais severa do que pela infecção pelo vírus da imunodeficiência Felina (FIV).

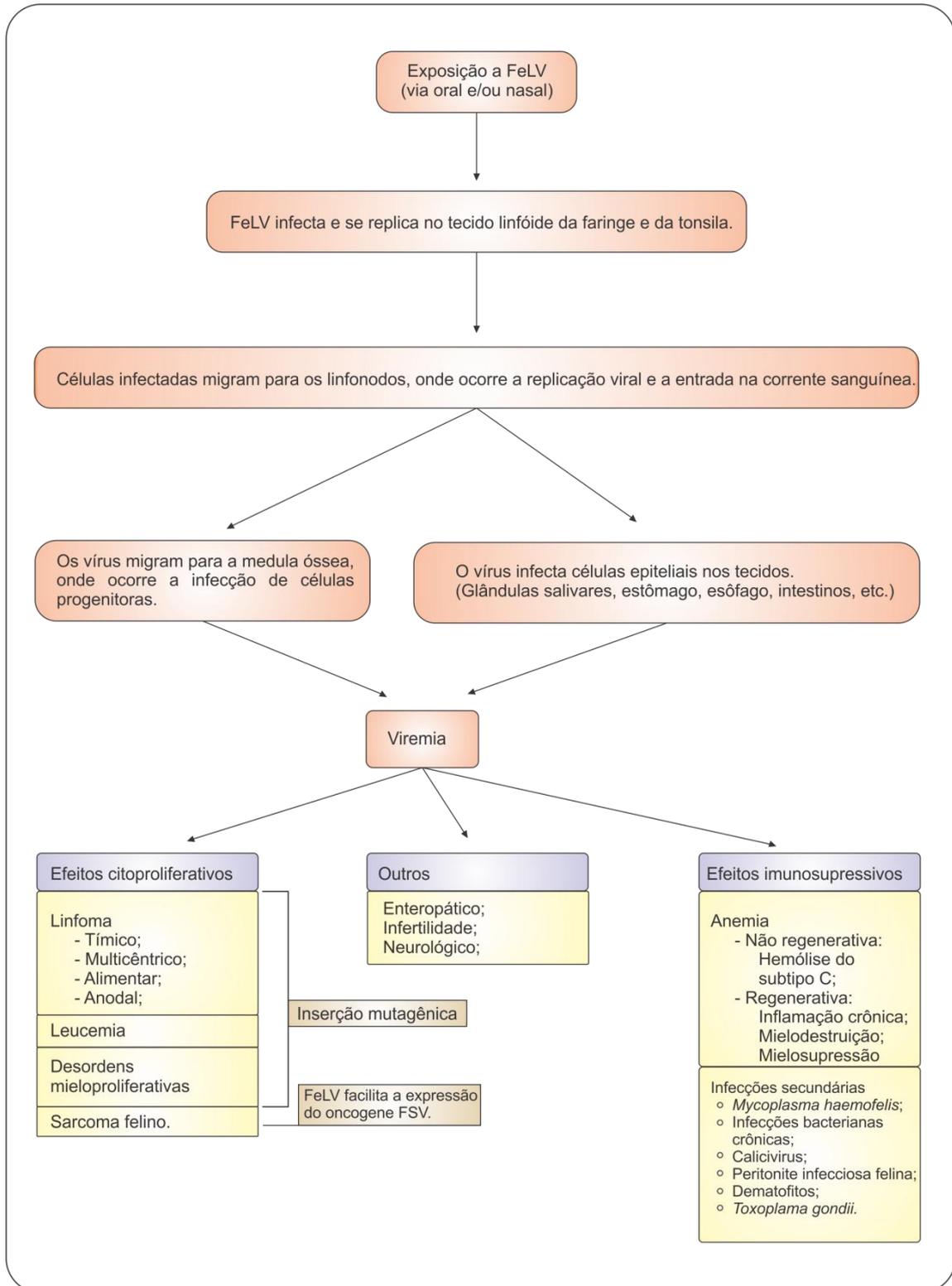


Figura 1. Patogênese da infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV). Mostrando a rota comum de entrada do vírus, locais de replicação e consequências patológicas da infecção.

Várias anormalidades já foram reportadas, incluindo atrofia tímica, linfopenia, neutropenia, anormalidades funcionais de neutrófilos, perda de células CD positivas, tendo destaque a perda de células CD8 (positivas) (OGILVIE *et al.*, 1988).

Devido às características da infecção por FeLV, independentemente se é possível identificar ou não os sinais clínicos, todo animal virêmico para FeLV é imunosuprimido (OROSZ *et al.*, 1985a, 1985b; PERRYMAN *et al.*, 1972), com retardo e decréscimo de respostas mediadas por anticorpos primários e secundários. A supressão imunológica pode apresentar algumas consequências clínicas e também pode levar à infecção por outros agentes infecciosos secundários, que de uma forma geral são resistentes por parte do hospedeiro, tais como *Salmonella* spp. Outras doenças secundárias, como infecções respiratórias, gengivite crônica, estomatite e infecções na bexiga podem surgir. Além disto, ocorre exacerbação de doenças ocasionadas por outros patógenos, tais como poxvírus, *Mycoplasma haemofelis*, *Cryptococcus* sp. e infecções normalmente não patogênicas para gatos, como a desenvolvida por *Toxoplasma gondii*. Em todo caso, a infecção por FeLV pode levar também à predisposição a doenças refratárias em animais saudáveis como a estomatite e a rinite crônica (KNOWLES *et al.*, 1989; TENORIO *et al.*, 1991), sendo que alguns problemas clínicos, por exemplo, a rinite crônica e abscessos subcutâneos, podem levar mais tempo para serem debelados em gatos infectados por FeLV, em relação a gatos não infectados, além de maior recorrência.

2.5.2. Anemia

Gatos infectados por FeLV podem desenvolver vários tipos diferentes de anemia, que são em geral não-regenerativas e raramente regenerativas. As anemias regenerativas, associadas com hemólise podem ser relacionadas com infecções oportunistas secundárias, por exemplo, por *Mycoplasma haemofelis* ou destruição imunomediada (KOCIBA, 1986; SCOTT *et al.*, 1973). FeLV-C interfere em uma proteína heme de transporte (COTTER, 1979; QUIGLEY *et al.*, 2000), que diretamente resulta em anemia não regenerativa. Anemias não regenerativas podem ser causadas por mecanismo inflamatório crônico, mielodestruição e mielosupressão (pancitopenia ou aplasia eritrocitária pura) e doença mieloproliferativa. Outras citopenias podem estar presentes, em particular trombocitopenia e neutropenia,

provavelmente causada por mecanismo imunológico mediado por indução viral e mielosupressão.

2.5.3. Linfoma

Gatos infectados por FeLV podem apresentar diferentes tipos de neoplasias, principalmente linfoma e leucemia, porém podem ocorrer patologias não hematopoiéticas. Linfomas induzidos por FeLV são os processos neoplásicos mais frequentes em gatos, sendo que as desordens mieloproliferativas são menos comuns e nem sempre estão associadas à infecção por FeLV (FRANCIS *et al.*, 1979; LOUWERENS *et al.*, 2005).

Formas diferentes de linfoma são classificadas de acordo com o local anatômico mais frequente:

- Forma mediastinal ou tímica;
- Forma alimentar, onde as células neoplásicas são associadas aos órgãos do trato digestivo;
- Forma multicêntrica ou periférica, que afeta os linfonodos;
- Forma extranodal ou atípica, apresentando neoplasmas solitários nos rins, sistema nervoso central ou pele.

Em alguns casos, o linfoma é disseminado para múltiplos órgãos e locais envolvidos (HARDY *et al.*, 1970; REINACHER; THEILEN, 1987). Fígado, baço, medula óssea, sangue e/ou órgãos não linfóides que, quando afetados, apresentam mal prognóstico. Já os gatos que desenvolvem algumas formas de linfoma sem conhecimento ou associação detectável com a infecção por FeLV levam a melhor prognóstico (VAIL; THAMM, 2005).

Tipos diferentes de leucemias agudas têm sido descritas, dependendo do tipo de célula neoplásica apresentada, assim como fibrosarcomas múltiplos em gatos virêmicos jovens, associados com infecções do vírus do sarcoma felino (FeSV), um vírus recombinante resultante do genoma de FeLV-A com oncogenes celulares (DONNER *et al.*, 1982; HARDY, 1981). No entanto, fibrosarcomas solitários ou alguns tipos de sarcomas não são relacionados nem com a infecção por FeLV ou por FeSV.

2.5.4. Outras doenças relacionadas com FeLV

Doenças mediadas imunologicamente, associadas com FeLV, têm sido reportadas, como anemia hemolítica, glomerulonefrite e poliartrite. Deposição de complexo antígeno-anticorpo e perda da atividade T supressora são os principais fatores que contribuem para estas doenças imunomediadas.

Linfoadenopatia periférica benigna tem sido diagnosticada em gatos infectados por FeLV (MOORE *et al.*, 1986), um quadro clínico que em geral é confundido com linfoma periférico.

Tabela 1. Neuropatias decorrentes da infecção por FeLV.

Doença	Sintomas
Anisocoria	Alteração que apresenta tamanho (diâmetro) desigual das pupilas do animal.
Midríase	Corresponde a dilatação da pupila em decorrência da contração do músculo dilatador da pupila.
Síndrome de Horner	É o conjunto de sintomas relacionados com a perda momentânea ou permanente da inervação autônoma simpática.
Incontinência urinária	Perda involuntária do controle da micção.
Vocalização anormal	Emissão de sons diferentes do normal, expressando ou não algum tipo de problema fisiológico no animal.
Hiperestesia	Distúrbio neurológico que se dá ao excesso de sensibilidade de um sentido ou órgão a qualquer estímulo.
Paresia	Corresponde a (uma) paralisia incompleta ou diminuição da motricidade em uma ou mais partes do corpo, devida à lesão dos centros nervosos, das vias motoras ou devida a lesões do sistema nervoso periférico, inclusive na junção neuromuscular.
Paralisia	É a diminuição ou a extinção da motricidade, em uma ou mais partes do corpo, devida a lesão dos centros nervosos, das vias motoras (piramidal ou extrapiramidal), ou devida a lesões no sistema muscular. Designa habitualmente uma carência completa da força muscular.

Enterites crônicas associadas com a degeneração das células epiteliais do intestino e necrose têm sido associadas à infecção por FeLV em gatos em que o

vírus está presente nas células das criptas intestinais (REINACHER, 1987). Doenças degenerativas e inflamatórias do fígado também têm sido associadas à infecção por FeLV (REINACHER, 1989).

Desordens reprodutivas e síndromes fetais também têm sido relacionadas com FeLV. Reabsorção fetal, aborto e morte neonatal são as manifestações principais (HARDY, 1981). Síndromes fetais e desordens reprodutivas são raramente observadas nos dias atuais, graças ao controle da alta prevalência da infecção em criatórios de gatos, por meio do uso de testes de rotina. No entanto, no Brasil ainda não temos tais atuações tão comprometidas com o controle epidemiológico descrito.

Doenças neurológicas não associadas ao linfoma do Sistema Nervoso Central (SNC) ou infecções oportunistas do SNC têm sido relacionadas, principalmente neuropatias (Tabela 1).

2.6. O genoma de FeLV

O genoma de FeLV apresenta três genes 5'-*gag-pol-env-3'*, essenciais para a replicação, os quais codificam proteínas (Tabela 2). O gene *envelope* (*env*) codifica a proteína de superfície gp70 (SU) e a proteína transmembrânica p15E (TM). O gene *polimerase* (*pol*) codifica a transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN). Já o gene responsável por um grupo específico de antígenos (*gag*) codifica as proteínas estruturais do vírus, p15 (MA), p12, p27 (CA) e p10 (NC) (COFFIN, 1979b) (Figura 2). As proteínas estruturais produzidas em excesso nas células infectadas são conduzidas para a membrana e o citoplasma das células; já as proteínas virais livres são liberadas no plasma e nos fluidos teciduais após a morte da célula.

O estudo da ocorrência e controle de FeLV em animais é realizado via detecção de antígenos de FeLV no citoplasma de leucócitos presentes no sangue periférico através de imunofluorescência indireta e ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assays”).

Todos os retrovírus, incluindo FeLV, são vírus de RNA envelopados que transcrevem o DNA de forma intermediária para realizar a sua replicação. Uma fita simples de RNA genômico é transcrito de forma reversa em DNA, o qual é

usualmente integrado no genoma da célula através da ação da integrase (TEMIN; MIZUTANI, 1970). O DNA integrado é conhecido como provírus e, após a transcrição reversa, ocorre a síntese de proteínas virais seguida do acoplamento de vírions próximo à membrana celular, onde ocorre o brotamento viral (COFFIN, 1979b).

Tabela 2. Função e localização das proteínas do FeLV (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

Gene viral	Proteína	Abreviação	Função, atividade enzimática ou localização no vírus.
gag	p15	MA	Proteína da Matriz
gag	p12	? ^a	Desconhecido
gag	p27	CA	Proteína do capsídeo
gag	p10	NC	Proteína do nucleocapsídeo
pol	p14 ^b	PR	Protease
pol	p80	RT	Transcriptase reversa
pol	p46 ^b	IN	Proteína de integração
env	gp70	SU	Proteína de superfície
env	p15E	TM	Proteína transmembrânica

^a Proteína ainda não caracterizada e, portanto, sem abreviação.

^b Caracterização via analogia com proteína do MuLV, não caracterizada por completo para FeLV.

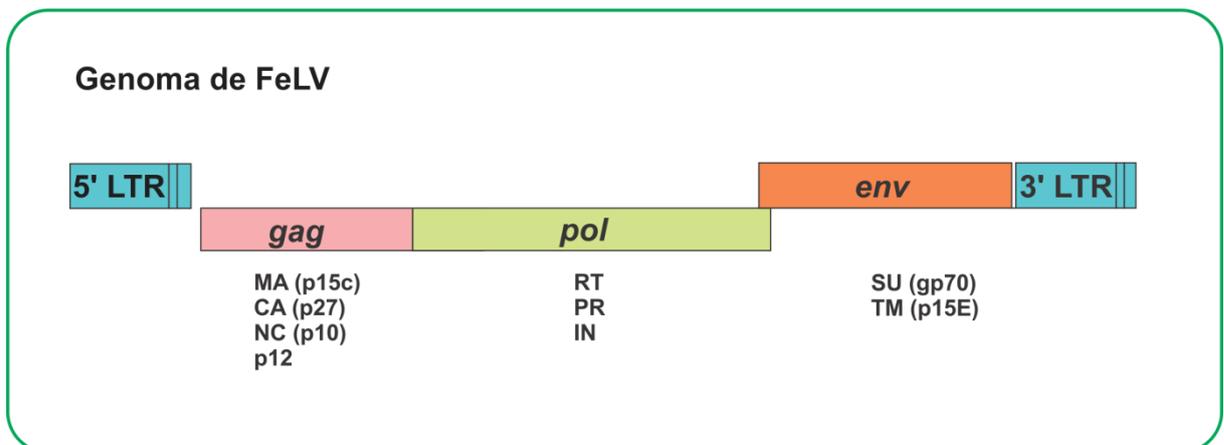


Figura 2. Estrutura do genoma do provírus de FeLV. Os genes presentes correspondem a *gag* (grupo específico de antígenos), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). O gene *gag* é responsável pela produção das proteínas matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC), já o gene *pol* expressa a transcriptase reversa (RT), a protease (PR) e a integrase (IN), enquanto o gene *env* expressa a proteína de superfície de membrana (SU) e a proteína transmembrânica (integral) (TM). O LTR

corresponde à região terminal de longa repetição presente nos flancos do provírus que regulam sua expressão gênica.

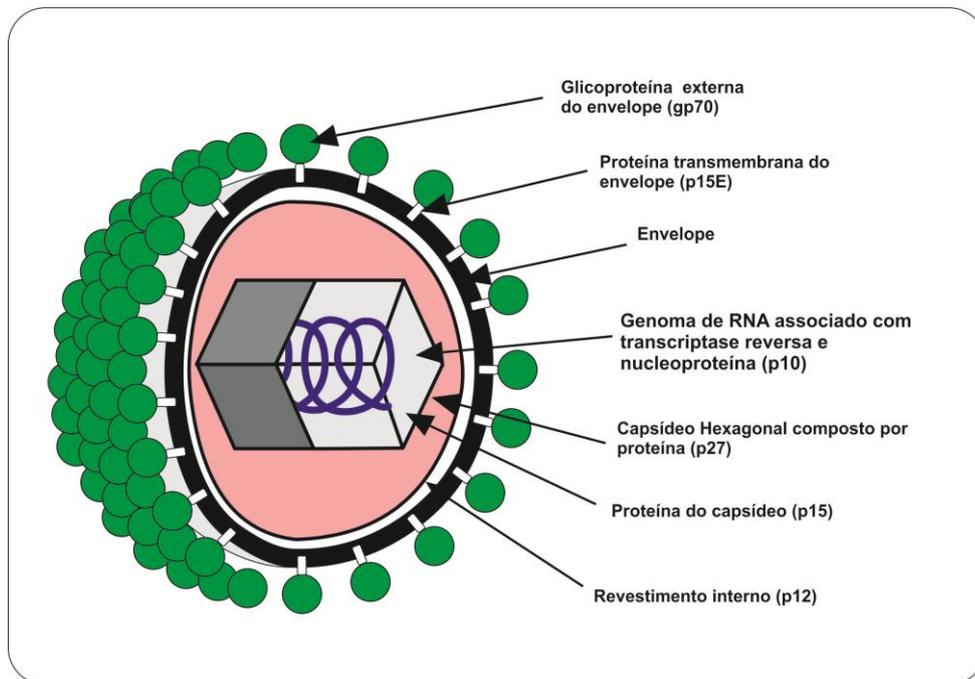


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura de FeLV. A glicoproteína gp70, juntamente com a proteína p15E, fazem parte do envelope viral. O genoma viral e a transcriptase reversa estão envolvidos pelo capsídeo, formado pelas proteínas p10 e p27. Além disto, observamos a presença da proteína p12 no revestimento interno de FeLV.

Além do vírus exógeno de FeLV, nos gatos domésticos encontramos duas formas de *gammaretrovírus* endógenos conhecidos como: Vírus endógeno da leucemia Felina (enFeLV) (SOE *et al.*, 1983) e o vírus RD114 (SARMA *et al.*, 1973). Tudo indica que o enFeLV foi originado há centenas de milhares de anos em gatos que se alimentavam de ratos infectados com o Vírus da Leucemia Murina (MuLV), que adquiriram a capacidade de se incorporar ao genoma de células germinativas de seus predadores, passando para toda a prole. A expressão de enFeLV é variável entre diferentes raças de gatos, sugerindo que a exposição relacionada ao MuLV é um fenômeno contínuo entre esses animais (TANDON *et al.*, 2007). O genoma de enFeLV não é completo e, portanto, não é capaz de se auto-replicar (SOE *et al.*, 1983).

O vírus RD114 tem origem nos primatas, apresenta replicação competente, tendo origem há centenas de milhares de anos em um ancestral do gato que se alimentava de primatas, inicialmente infectados com o RD114 (BARBACID *et al.*, 1977). As células de felinos não são susceptíveis ao vírus RD114, porém células de humanos e cachorros são susceptíveis ao processo de replicação viral. Sendo

assim, RD114 não é patogênico para gatos. Apesar de o vírus RD114 não se replicar em células de gatos, podemos observar a expressão de RNA mensageiro e proteína p30 em tecidos linfóides independentemente da presença da infecção por FeLV. Múltiplas cópias completas do genoma viral do RD114 são encontradas em todas as células de gatos domésticos (“ABCD guidelines on Feline Leukaemia Virus”, 2007)

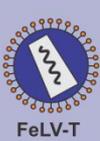
Subtipos	TROPISMO	RECEPTOR	PREVALÊNCIA	INFORMAÇÕES
 FeLV-A	Rins, Fígado, Células T, parte do intestino delgado.	THTRI (Proteína transportadora de tiamina).	100% em gatos infectados	Considerado como FeLV originalmente transmitido.
 FeLV-B	Ampla gama de tecidos.	Pit 1 e Pit 2.	Ocorre com FeLV A em 49% dos gatos infectados.	Surgiu através da recombinação de FeLV A e sequências endógenas.
 FeLV-C	Célula progenitora eritróide.	FLVCR I (Exportadores de Heme).	1% dos gatos infectados.	Surgiu através da mutação no gene de <i>env</i> de FeLV.
 FeLV-T	Células T.	Pit I em combinação com co-receptor, FeLIX.	Desconhecido	Surgiu da evolução de FeLV A (mutação e recombinação)

Figura 4. Descrição dos subtipos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV), tropismos e prevalência em gatos infectados. Os quatro subtipos de FeLV surgiram através de mutação e recombinação. Cada subtipo usa diferentes receptores do hospedeiro para entrar na célula, resultando em diferente tropismo tecidual.

Quanto à classificação, existem 4 tipos de FeLV: A, B, C e T (ANDERSON *et al.*, 2000; RUSSELL; JARRETT, 1978) (Figura 4). Os subtipos são definidos de acordo com a sequência de *env*. FeLV-A corresponde ao subtipo predominante, sendo isolado de todos os gatos infectados e transmitido exogenamente entre os animais. FeLV-B aparece em aproximadamente 50% dos gatos devido à recombinação entre FeLV-A e enFeLV. Infecções com o vírus FeLV-B podem

influenciar no curso da doença, por exemplo, acelerando a geração de linfomas ou aumentando a neuropatogenicidade (ROY-BURMAN, 1995). FeLV-C raramente aparece em gatos infectados com FeLV-A, devido aos pontos de mutação no gene de *env* e ao fato de que invariavelmente causa o desenvolvimento rápido de anemia fatal. Os vírus de FeLV-B e FeLV-C usualmente não são transmissíveis para outros gatos. Ao invés disto, tais vírus apresentam a chance de surgir novamente em gatos infectados com FeLV-A. Recentemente, uma variante de FeLV associada à imunodeficiência foi descrita, designada FeLV-T, apresentando marcante tropismo por linfócitos T (ANDERSON *et al.*, 2000, 2001). FeLV-T está intimamente relacionado com FeLV-A, do qual evoluiu após várias mutações no gene *env*.

2.7. O ciclo de replicação de FeLV

O ciclo viral de FeLV, de uma forma geral é análogo ao ciclo de todos os retrovírus (Figura 5).

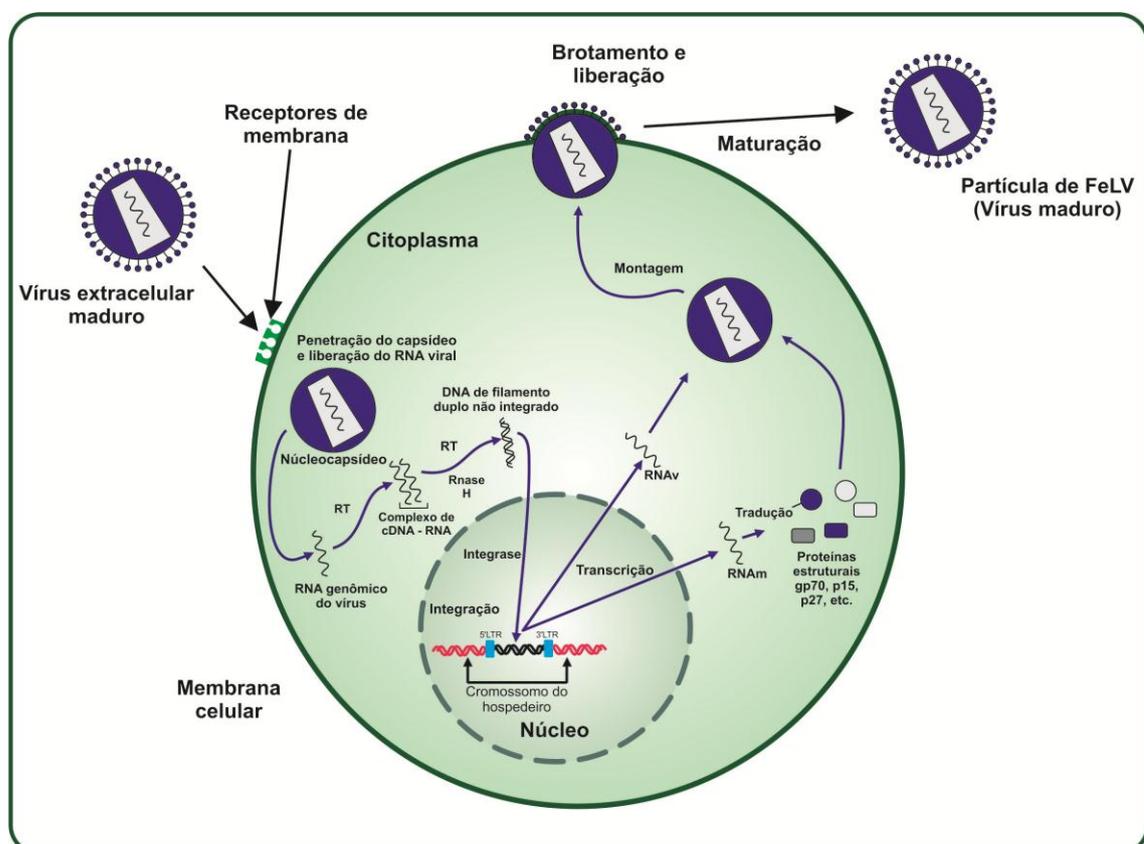


Figura 5. Ciclo do Vírus da Leucemia Felina (FeLV). O vírus entra na célula através da compatibilidade entre as proteínas do envelope e de receptores do hospedeiro. Após a entrada na célula, ocorre a desencapsidação e o processo de transcrição reversa, que leva a formação de DNA a partir do RNA viral. O DNA é então encaminhado para o núcleo e ocorre o processo de integração no

material genético celular. Após a integração ocorre a transcrição e produção de RNA genômico e RNA mensageiro para a produção de proteínas virais, que são direcionadas à proximidade da membrana plasmática, realizando a formação do vírion, que sai por brotamento. Após sair da célula, a partícula viral sofre o processo de maturação.

A infecção por FeLV tem a entrada do vírus na célula definida na ligação das proteínas do envelope ao receptor do hospedeiro, que é dependente do subtipo de FeLV (Figura 4). Uma vez dentro da célula infectada, o genoma de RNA serve de molde para a síntese de DNA viral por ação da transcriptase reversa (COFFIN, 1979a, 1992). Sequencialmente o DNA viral é transportado ao núcleo, onde é integrado ao genoma do hospedeiro, através da ação enzimática da integrase viral. O DNA viral integrado é eventualmente transcrito para produzir RNA que serve tanto para o RNA genômico, como para RNA mensageiro (RNAm), para a produção de proteínas virais. Traduzidas, as proteínas Gag e Pol são transportadas até a membrana celular, onde a progênie de vírions brota juntamente com pedaços da membrana celular. Com o brotamento viral, clivagens enzimáticas das proteínas virais levam a mudanças estruturais no vírion, que são necessárias para a maturação e formação de partículas virais infecciosas (COFFIN, 1979a, 1992) (Figura 5).

2.8. Tratamento

2.8.1. Vacinas e suas limitações

Além da contenção de gatos infectados, vacinas comerciais para FeLV, como Leukocell® da Pfizer ou Purevas® da Merial, são comercializadas, podendo reduzir de forma significativa a disseminação e instalação de reservatórios virais de FeLV. Essas vacinas, em detalhes, são derivadas de antígenos quimicamente inativados ou têm origem na recombinação viral, respectivamente, e não oferecem imunidade estéril (essas vacinas, em sua essência, preparam o sistema imunológico do gato para eliminar o vírus após a exposição do animal) (HOFMANN-LEHMANN, REGINA *et al.*, 2006; SPARKES, 1997; SPARKES, 2003). Nos Estados Unidos da América, ao invés de incluir como parte do plantel de vacinas de rotina, o regime de vacinação é destinado para populações de alto risco, como gatos que possuem acesso livre ao ambiente externo a sua moradia.

Existem várias razões para essas vacinas serem reservadas a populações de risco. A relação entre a vacina para FeLV e sarcoma felino é um dos importantes eventos que não colocam essas vacinas dentre o grupo de vacinas de rotina. Sarcoma associado com vacina (SAV) corresponde à neoplasia maligna agressiva que requer procedimento cirúrgico e muitas vezes tratamento com quimioterapia (MADEWELL *et al.*, 2004; The Merck Veterinary Manual, 2005). A associação de SAV é a principal razão pela qual muitos proprietários de animais não os vacinam contra FeLV. A segunda razão pela qual a vacina contra FeLV não faz parte das vacinas de rotina é a de que pequena população de gatos, que não tem acesso ao ambiente externo, é susceptível à infecção pelo vírus, fazendo do SAV risco maior do que a própria infecção por FeLV. A terceira razão é o fato de que as vacinas para FeLV apresentam eficácia ainda desconhecida por completo e de difícil determinação. Por exemplo, 50% dos gatos eliminam o vírus, 40% tornam-se persistentemente infectados e os outros 10% apresentam infecção latente após a vacinação. Finalmente, a eficácia necessita ser determinada através do estabelecimento de grupos baseados na idade dos animais, dado que gatos mais jovens são mais susceptíveis à infecção do que indivíduos mais velhos (FLYNN, J. N. *et al.*, 2000; The Merck Veterinary Manual, 2005). A análise dos resultados de estudos que têm examinado a eficácia é difícil, porque as diferenças no “design” dos estudos, linhagens virais e a idade que os gatos são submetidos à infecção viral são significativamente diferentes.

A verdadeira incidência do sarcoma associado à vacina em gatos não é totalmente conhecida. Os sarcomas desenvolvem-se nos sítios anatômicos onde a vacina foi injetada, em taxas que variam de 1 – 10 casos para 10.000 gatos, aparecendo principalmente após a administração de vacina anti-rábica e de vacina contra FeLV (COYNE *et al.*, 1997; HENDRICK *et al.*, 1992; KASS *et al.*, 1993). Essas estimativas são baseadas em estudos retrospectivos epidemiológicos e pesquisas de biópsias submetidas a laboratórios de diagnóstico em conjunto com estimativas da população de gatos dos EUA e do número de visitas anuais ao veterinário, e sugerem que entre 2.200 e 22.000 gatos irão desenvolver sarcomas associados a vacinas a cada ano. No Brasil não temos dados que possam aproximar estes dados à realidade da população de gatos presentes no país.

Em um estudo envolvendo 345 gatos (KASS *et al.*, 1993) na detecção de sarcomas associados à vacina, o risco de um gato desenvolver um sarcoma após a

administração de uma única vacina na região cervical, interescapular (um local não recomendado pela “American Association of Feline Practitioners”), mostrou-se 50% maior que em um gato que não recebeu qualquer vacina neste local. No mesmo estudo, o risco de um gato que recebeu duas vacinas no mesmo local foi de aproximadamente 127% maior, e o risco de um gato que recebeu 3 ou 4 vacinas foi 175% maior do que o risco de um gato que não recebeu vacinas no local designado. O tempo para o desenvolvimento desses neoplasmas nos gatos após a vacinação variou entre três meses até 3 anos ou mais.

Os tumores são em geral pouco comuns em gato, no entanto, os tumores malignos, como sarcomas, ocorrem com relativa frequência. SAV tem despertado grande interesse por causa de sua ligação a certos tipos de vacina como descrito anteriormente. O neoplasma apresenta um comportamento biológico maligno extremo, sendo ao mesmo tempo localmente agressivo e metastático em 25 a 70% dos casos. Embora a patologia ainda permaneça incerta, uma resposta inflamatória exagerada/granulomatosa parece ser o fator principal na transformação por SAV (KIRPENSTEIJN, 2006).

Muitos donos de animais não os vacinam por receio das complicações por SAV, e ainda porque a eficiência da vacina não é muito convincente. A população não vacinada, assim como os gatos vadios, permanecem sob o risco de contrair FeLV, e são significativas fontes de transmissão. A prevalência de FeLV em populações de gatos é evidente em clínicas veterinárias, onde representam significativa demanda de tratamento.

2.8.2. Drogas antivirais e novas oportunidades de tratamento

A falta de tratamento efetivo leva muitos donos a optarem por formas paliativas de tratar os gatos infectados por FeLV. O tratamento paliativo inclui a utilização de medicamentos para tratar a doença, redução da dor, suporte nutricional e manutenção do animal da forma mais confortável possível, aumentando assim a qualidade de vida.

Apesar de alguns antivirais e moduladores imunológicos terem sido reportados como medicamentos usados na melhora da qualidade de vida de gatos infectados por FeLV, não há estudos que tenham demonstrado de forma concreta que algum antiviral ou moduladores imunológicos melhoram a qualidade ou

prolongam a vida de felinos infectados por FeLV no uso clínico até os dias atuais, de forma significativa. Dentre os antivirais utilizados para o tratamento de doenças por etiologia por FeLV, destacamos a azidotimidina (AZT), primeira droga antirretroviral usada no tratamento de enfermidades de etiologia por HIV. O AZT corresponde a um nucleosídeo análogo que acaba sendo incorporado ao DNA viral durante a transcrição reversa. O AZT não tem a hidroxila 3', necessária para a polimerização do DNA viral, resultando na finalização da síntese do DNA. Em todo caso, o AZT é o antiviral primário, de uso clínico para o tratamento de enfermidades etiologicamente associadas a FeLV, tendo pouca literatura que suporte a habilidade para conferir algum ganho para o animal no curso da infecção quando já estabelecida. Estudos têm sugerido que o tratamento de gatos com AZT 24 horas antes ou até 24 horas após a infecção pode diminuir ou eliminar a infecção (NELSON *et al.*, 1995; TAVARES *et al.*, 1987), porém não temos estudos que apontam a eficácia do uso de AZT no prolongamento da vida de animais, uma vez que a infecção foi estabelecida de forma artificial. Os estudos que indicam que o AZT pode ser eficiente demonstraram que mesmo pequenas melhorias nos indicadores da doença foram associadas com certa toxicidade da droga (HASCHEK *et al.*, 1990). Sendo assim, as limitações do uso de AZT em gatos infectados correspondem à falta de eficácia aparente em doses toleráveis.

De forma similar aos antivirais, estudos reportando à eficiência de imunomoduladores carecem de controles apropriados e/ou não têm sido verificado de forma independente. Um destes imunomoduladores que apresenta pequena eficácia é o imuno modulador de linfócitos T (LTCl). O LTCl é proteína produzida por células epiteliais tímicas estromais, cujos fabricantes afirmam induzir citocinas atrativas para células citotóxicas T CD8, que atacam células infectadas. Também afirmam que o LTCl promove a melhora clínica em gatos infectados por FeLV. Essas afirmações não são documentadas em literatura com corpo editorial, sendo que os dados fornecidos pelo fabricante não demonstram melhoras que se traduzem em melhora da qualidade de vida ou no aumento da expectativa de vida de animais infectados por FeLV (GINGERICH, 2008).

A proteína A de *Staphylococcus aureus* (SPA), um polipeptídeo bacteriano purificado de paredes celulares de *Staphylococcus aureus* Cowan I, é possivelmente o único modulador imunológico com evidência suficiente para suportar sua habilidade em produzir melhoras em gatos infectados por FeLV. No entanto, o mecanismo

ainda não é claro, sendo descrito como um ligante de IgG, principalmente na forma de um complexo imune e raramente na forma monomérica. Isto tem levado à especulação de que a SPA estabelece uma ligação a IgG que está associada a “fator de bloqueio”, que facilita o desenvolvimento de neoplasia ou o escape viral do controle imunológico. No entanto, a SPA remove o fator do complexo de bloqueio antígeno-anticorpo, levando o sistema imune a reagir a invasão viral. Outros trabalhos têm sugerido que SPA estimula o sistema imune via indução da síntese de anticorpos, expressão de interferon, potencializando a atividade dos linfócitos matadores naturais. Em todo caso, alguns estudos têm demonstrado que SPA pode melhorar a expectativa de vida de gatos infectados por FeLV (DAY *et al.*, 1984). O regime de tratamento exige custo considerável e acompanhamento clínico especializado, necessitando internação seguida por tratamentos duas vezes por semana. Sendo assim, resultados conflituosos quanto à eficiência do tratamento, juntamente com o custo e o tempo associado ao tratamento, mostram que o SPA não é opção clínica de tratamento factível.

2.9. RNA de interferência

O projeto genoma não só revelou a constituição genética, como também possibilitou a melhora tecnológica, baseada em sequências genômicas dos humanos e de vários outros organismos. No entanto, apenas a sequência de nucleotídeos não é suficiente para identificar as funções gênicas, fazendo das estratégias de bloqueio ou super-expressão, análises importantes no processo de elucidação fenotípica.

O conhecimento sobre o fenótipo, *in vivo*, após o bloqueio da expressão gênica é pré-requisito para possível terapia baseada na supressão da expressão de alvos específicos, haja vista que a inibição da expressão viral tem se tornado muito importante. No entanto, a geração de animais transgênicos costuma ser muito trabalhosa e consideravelmente cara. De forma alternativa, o silenciamento genético pode ser realizado pela tecnologia do RNA de interferência (RNAi) , baseado na maquinaria da célula hospedeira.

Desde que foi descoberto por Fire e Mello (FIRE *et al.*, 1998) em organismos denominados *Caenorhabditis elegans* em 1998, que os levaram ao prêmio Nobel em

2006 e por Tuschl *et al* (ELBASHIR *et al.*, 2001) em células de mamíferos em 2001, o RNAi foi rapidamente adotado pela comunidade científica como ferramenta versátil com amplo espectro de aplicações, como o estudo de alvos genéticos para utilização e associação de drogas. A principal vantagem do uso terapêutico do RNAi reside em sua capacidade especial e potente de promover inibição pós transcricional da expressão de genes causadores de doenças com sequências relacionadas conhecidas, de forma específica.

O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) é via metabólica básica nas células eucariontes, uma vez que essas células apresentam as moléculas responsáveis pela clivagem de RNA de fita dupla e degradação do mesmo. Estudos demonstram que dsRNA (RNAs de dupla fita), quando presentes no citoplasma de mamíferos, podem provocar reações fisiológicas, que levam à indução da síntese de interferon (STARK *et al.*, 1998). Nesta resposta via interferon, dsRNA > 30 bp se ligam e ativam a proteína quinase PKR (MANCHE *et al.*, 1992) e 2',5' oligoadenilato sintetase (2',5'-AS) (BAGLIONI *et al.*, 1981). Uma vez ativada, PKR pode impedir a tradução via fosforilação de fatores de tradução como eIF2 α e ativando 2',5'-AS, que levam à degradação do RNAm via ativação de 2',5' oligoadenilato Ribonuclease L. A resposta induzida por dsRNA, porém não é sequência específica.

Em contraste com a ativação de cascatas de sinalização celular, onde a célula é exposta a longas sequências de RNA de dupla fita (dsRNA > 30 bp), o RNAi é mediado por curta cadeia de RNA de dupla fita levando a via de silenciamento gênico ao nível do RNAm (pós-transcricional) de maneira sequência específica.

Sequências complementares perfeitas dsRNA são fragmentadas pela Dicer, membro da família das ribonucleases III (RNase III), em pequenos RNAs interferentes (siRNA) com 21 – 23 nucleotídeos (nt), com 2 a 3 nt não pareados na extremidade 3' (KIM, V. N., 2005). Algumas vezes, o uso de RNAi apresenta problemas relacionados com a ação sobre o alvo, que podem ser evitados ou reduzidos pela realização de modificações na sequência de nucleotídeos, a fim de que se alterem a termodinâmica e as propriedades de pareamento (ECHEVERRI; PERRIMON, 2006; ECHEVERRI *et al.*, 2006; LUBINI *et al.*, 1994; MONIA *et al.*, 1993). Os fragmentos liberados após a ação da Dicer são incorporados a um complexo protéico chamado de Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) e subsequentemente desenrolada pela proteína multifuncional Argonauta 2,

contida dentro de RISC. Quando ativado, o RISC, o qual contém a fita antisense (ou fita guia) de siRNA, direciona o siRNA ao RNAm alvo com sequência complementar, levando à degradação do RNAm alvo. O RISC ativado pode se mover e destruir outros RNAm alvos, que acabam propagando o silenciamento gênico (HUTVÁGNER; ZAMORE, 2002a, 2002b). Esse efeito pode ser induzido por siRNA sintético, promovendo efeito silenciador por mais de sete dias em células com rápida divisão, e por várias semanas em células em repouso (BARTLETT; DAVIS, 2006, 2007). Sendo assim, o RNAi corresponde a um método simples, barato e seletivo de inibição gênica com alto índice de sucesso (COUZIN, 2002).

Considerando que alguns eventos nucleares são exclusivos para a via endógena ou exógena do RNA de interferência (RNAi), muitas etapas de processamento nuclear e todas as etapas de processamento citoplasmático são compartilhadas por ambas as vias, apresentando fontes potenciais de saturação (Figura 6). RNAi mediado por moléculas exógenas pode seguir a via de miRNA ou a via do siRNA, entrando nas vias em diferentes pontos, dependendo de moléculas específicas ou da forma de inserção utilizada. Muitos genes de miRNA são transcritos pela polimerase II antes do processamento nuclear realizado pelo complexo Drosha-DGCR8. Os miRNAs exógenos podem ser desenvolvidos com pri-miRNA, seguindo assim os mesmos passos, ou como sequências de shRNA, que entram no núcleo, porém são transcritos pela RNA polimerase III, passando assim pela transcrição nuclear e maquinaria de processamento utilizada pela via endógena. Todas as construções para expressão de RNAi convergem para o evento de exportação nuclear, passo passível de limitação ainda não totalmente elucidado. Uma vez no citoplasma, o dsRNA ainda apresenta dobramento da extremidade, derivado dos eventos de processamento nuclear ou da entrada de substratos exógenos para Dicer, que requerem processamento por TRBP-Dicer, resultando em duas fitas separadas. Os siRNAs exógenos não necessitam do processamento da Dicer, uma vez que já apresentam tamanho compatível com o produto da ação da Dicer. Todos os dsRNA convergem para a condução da fita guia em RISC, porém os miRNAs endógenos levam principalmente à repressão traducional, enquanto que o dsRNA leva à clivagem do RNAm alvo (Figura 6).

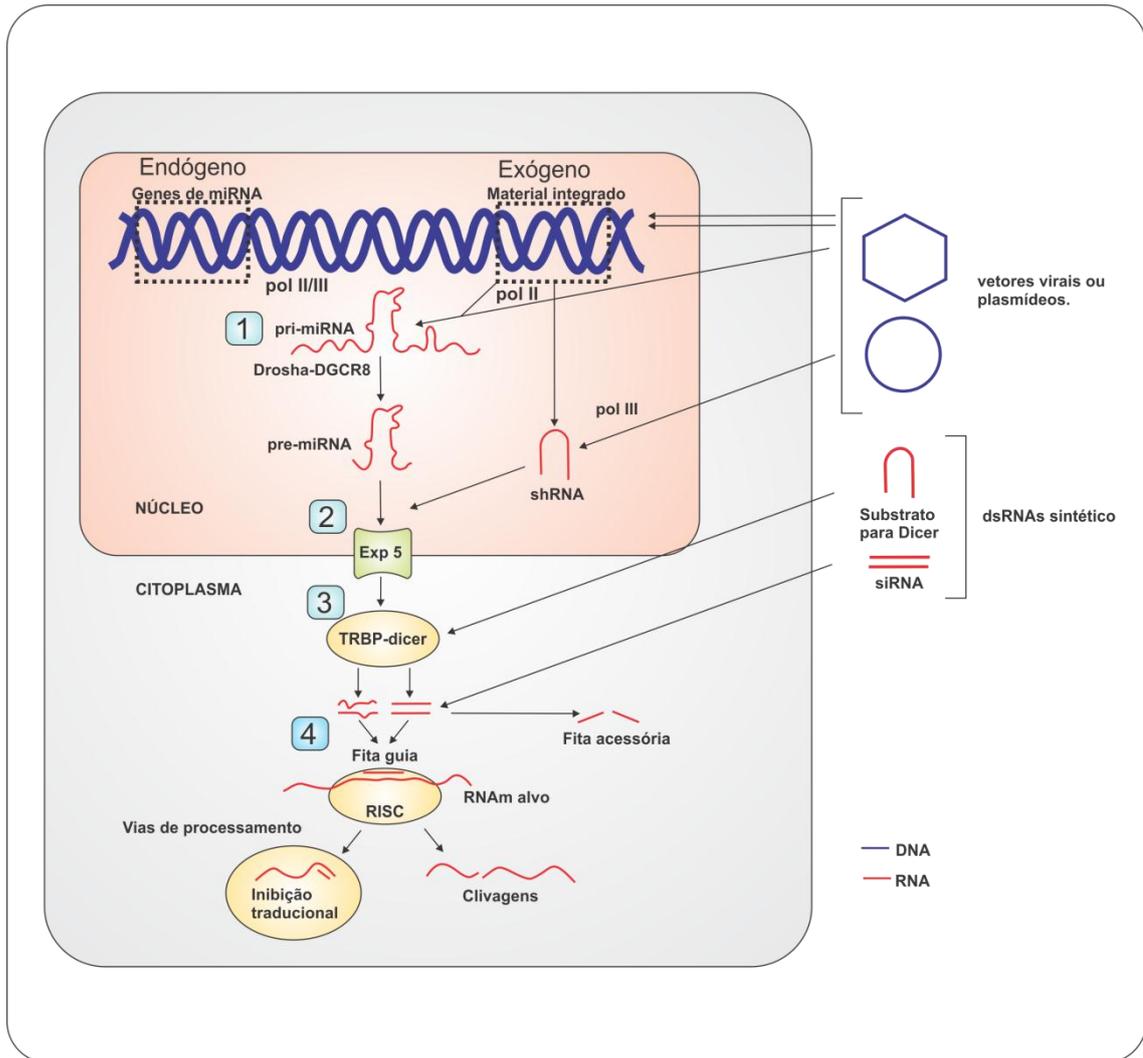


Figura 6. O processo de RNA de interferência e sua manipulação. Processamento nuclear feito pelo complexo Ddrosha-DGCR8 (1), exportação nuclear (2), processamento por TRBP-Dicer resultando em duas fitas separadas (3), condução da fita guia em RISC (4). Abreviações: DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8); pri-miRNA (primary microRNA); pol (RNA polymerase); RISC (RNA-Induced Silencing Complex); shRNA (short hairpin RNA); TRBP (trans-activation-responsive RNA binding protein).

As células eucariontes produzem vários tipos de pequenos RNAs que participam de diversas vias (BARTEL, 2004; BRODERSEN; VOINET, 2006; KIM, 2005; VAUCHERET, 2006). Em algumas espécies, as formas ativas de pequenos RNAs são muitas vezes indistinguíveis bioquímica ou funcionalmente, e acabam sendo convencionalmente agrupadas em duas classes baseadas em suas origens e sua biogênese: microRNAs (miRNAs) e pequenos RNAs interferentes (siRNAs). Os miRNAs são gerados de regiões precursoras de RNA dupla fita com dobramento, enquanto que o siRNA são derivados de longas cadeias de RNAs de dupla fita (LEE; KIM, 2005). O miRNA é transcrito primariamente como pri-miRNA, o qual é

processado intranuclearmente pelo complexo contendo a Drosha, uma enzima RNase III nuclear, e a proteína ligante de RNA dupla fita (DGCR 8) em pré-miRNAs. Estes são então exportados do núcleo para o citoplasma via exportina 5. No citoplasma, o pré-miRNA entra na mesma via do siRNA mencionada anteriormente. Ao final, tanto miRNA quanto siRNA se ligam ao RNAm e induzem a clivagem do RNAm, causando inibição traducional e decaimento independente de RNAm (KIM, V. N., 2006). Enquanto o miRNA induz predominantemente a repressão traducional devido a pareamento imperfeito ao seu RNAm alvo, o siRNA muitas vezes forma pareamento perfeito que leva à clivagem direta do RNAm alvo no local complementar (Figura 6).

2.9.1. Potenciais terapêuticos para RNA de interferência

A terapia baseada em RNAi para câncer é uma das aplicações mais promissoras para o vetoriamento viral (CHANG, KENNETH *et al.*, 2006; GRIMM; KAY, 2006; SUBRAMANYA *et al.*, 2010). Teoricamente, quando o siRNA é desenvolvido e utilizado de forma apropriada, a maquinaria do RNAi pode ser utilizada para silenciar quase todos os genes presentes no genoma. De fato, já está bem descrito na literatura que siRNAs sintéticos são capazes de nocautear alvos em várias doenças *in vivo* (CHENG *et al.*, 2003; ES, VAN; ARTS, 2005; FOUGEROLLES *et al.*, 2007). Testes experimentais demonstram que os alvos efetivos são os genes envolvidos nas vias celulares associadas ao câncer, oncogenes, devido à ligação única com certas células neoplásicas e genes anti-apoptóticos. Além disto, genes que participam das interações neoplasma-hospedeiro, tais como fatores relacionados com a angiogênese ou imunidade inata, e aqueles que conferem resistência à quimioterapia ou radioterapia, são alvos para o RNA de interferência (ELLIS; HICKLIN, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Como exemplo, temos tipos de câncer como o ovariano (HALDER *et al.*, 2006) e ósseo (TAKESHITA *et al.*, 2005) que estão sendo atualmente estudados e tratados de forma satisfatória via siRNA *in vivo*.

Outra área de interesse terapêutico é a área das neoplasias malignas causadas por miRNA. São os efeitos diretos do miRNA, o qual se acredita que regula cerca de um terço de todos os genes humanos transcritos (ou RNAm), que estão envolvidos em várias doenças humanas. A utilização da terapia gênica para

manipular os níveis de miRNA representa nova perspectiva de se controlar a expressão gênica, identificar alvos e elaborar terapias efetivas (MARQUEZ; MCCAFFREY, 2008). Nos últimos anos, os miRNAs têm se destacado cada vez mais no âmbito da patogênese do câncer, e temos dados que revelam várias ligações entre a expressão descontrolada de miRNA e o surgimento do câncer (CALIN; CROCE, 2006, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de miRNA *in vivo* pode reverter a progressão de um câncer de fígado (KOTA *et al.*, 2009). São estes fatores que abrem expectativas para o tratamento de câncer via utilização de RNAi.

Infecções virais também se transformam em excelentes alvos para RNAi, devido ao fato de que as fitas exógenas do agente infeccioso é única no organismo do hospedeiro, fato que minimiza os efeitos colaterais devido ao tratamento. Neste caso, consiste em se utilizar alvos presentes no material genético viral, envolvidos em sua replicação. No entanto, alguns vírus são capazes de escapar do efeito antiviral do RNAi. O uso de RNAi com sucesso contra vírus são relatados para o vírus da Hepatite B (HBV) (PU *et al.*, 2011), vírus do Papiloma Humano (HPV)(KHAIRUDDIN *et al.*, 2011), Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) (LI, B. *et al.*, 2005) e o vírus Respiratório Sincicial (RSV) (DEVINCENZO *et al.*, 2010).

Outras relevâncias terapêuticas relacionadas são doenças metabólicas, distúrbios cardíacos, doenças neurodegenerativas e doenças genéticas hereditárias. Um estudo publicado recentemente mostrou bons resultados no uso de siRNA contra o gene PCSK9, com o siRNA levando à redução de colesterol plasmático, e, portanto, levantando tratamento e controle potencial dessa doença. Testes para doenças arteriais coronárias também estão sendo realizados, através do uso de RNAi contra genes (c-myc) responsáveis por causar problemas após o uso da inserção de “stent” (restenose) (LI, F.-Y. *et al.*, 2009). Outros estudos mostraram casos, quase que completamente resolvidos, de fibrose de fígado com sobrevivência prolongada, *in vivo*, em ratos submetidos a tratamento com siRNA sintéticos. A eficiência terapêutica revela uso potencial na reversão de cirrose crônica em humanos (SATO *et al.*, 2008).

O primeiro caso clínico realizado foi para a degeneração macular relacionada à idade (AMD) (MCFARLAND *et al.*, 2004). Já em 2004, a companhia Sirna apresentou os primeiros dados clínicos para drogas baseadas em RNAi, o

componente AGN-745, antigamente denominado Sirna contra AMD. A companhia OPOKO Health lançou o primeiro siRNA em teste de fase III em 2007, chamado Bevasiranib, o primeiro na classe de droga de siRNA designado para silenciar genes produtores de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), até então responsável pela perda de visão em AMD. Infelizmente em março de 2009, a fase III experimental foi finalizada devido à revisão realizada por um comitê independente. Apesar de todos estes estudos experimentais, os dados ainda são insuficientes para se propor terapia em humanos.

Essas falhas nos estudos clínicos de fase III têm revelado a utilização da segunda geração de siRNA, por exemplo, a utilização de vetores para expressão de shRNA, resultando em maior eficiência na transferência e expressão.

2.9.2. Inserção celular e transcrição do RNAi

Em verdade, existem várias vias diferentes de realizar a interferência por RNA. Muitas das proposições clínicas propostas foram baseadas na incorporação de siRNA quimicamente sintetizados com 21 nt com 2 nt não pareados na extremidade 3'. Este modo de administração é transitório, haja vista que a concentração dos siRNAs é reduzida ao passo que ocorre a divisão celular. Em todo caso, os siRNAs dupla fita são carregados negativamente e acabam não sendo tão fáceis de penetrar na membrana celular hidrofóbica sem a ajuda de carreadores químicos, moléculas de carga positiva que interagem com o DNA, neutralizando a sua carga negativa, formando um complexo que possibilita sua passagem pela membrana citoplasmática. Além disto, siRNA não modificados e desprotegidos são rapidamente degradados por RNases.

Em contraste, a expressão intracelular de pequenos RNAs com dobramentos possibilitam o nocaute para os genes com prazo maior de duração, ou seja, até o momento em que ocorrer a expressão deste shRNA. Por exemplo, a terapia de doenças crônicas requer exatamente isto: a inibição do gene alvo por longo período de tempo. Portanto, acredita-se que um veículo de expressão ideal facilite o escape endossomal/lisossomal e, no caso de shRNA, apresente o acesso ao núcleo celular. Os vírus e seus vetores derivados conseguem fazer com destreza e precisão essas funções, transformando-se no maior mecanismo de entrada e expressão de shRNA.

O RNAi nas células pode ser induzido via expressão intracelular de RNAs curtos com dobramentos, assim como shRNAs ou miRNAs sintéticos (ELBASHIR *et al.*, 2001; XIA *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2002). A unidade básica do shRNA transcrita corresponde a uma sequência senso e antisenso complementar conectada por uma região dobrada (loop) não pareada. Os miRNAs são tipicamente expressos como uma parte longa de transcritos primários (pri-miRNAs) (CAI *et al.*, 2004). Os miRNAs são os mais próximos do substrato de RNAi endógeno, além de serem mais acessíveis para a transcrição por Pol-II e, talvez o meio mais atrativo para a terapia gênica (CAI *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2006). No entanto, dados presentes sobre estratégias baseadas em shRNA e miRNA artificiais têm sido comparados, apresentando resultados conflitantes (BODEN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2005), mostrando assim que a escolha é sempre dependente da estratégia, influenciando no sucesso obtido de forma experimental (LIU *et al.*, 2010).

2.9.3. Expressão de shRNA via vetores virais

A combinação do RNAi com vetores virais para terapia gênica é estratégia promissora em várias situações, em que o controle temporal do silenciamento gênico e/ou a supressão persistente do alvo é altamente crítico. O “design” dos vetores virais para RNAi tornou-se possível após a descoberta de promotores que possibilitam a expressão de RNAs com dobramento na extremidade (shRNA) capazes de induzir o desdobramento da maquinaria de RNAi (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002). Felizmente, a expressão de shRNA necessita de sequências muito pequenas, sendo possível a inserção no material genético desses vetores virais.

2.9.4. Vetores Lentivirais

Os Lentivírus (LV) correspondem à subclasse de retrovírus, que como todos os retrovírus, apresentam duas cópias idênticas de uma fita simples de RNA em seu genoma, envolvidas por um capsídeo e por um envelope. Dentre os diferentes representantes do gênero *Lentivirus*, os que apresentam mais destaque são o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), assim como o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV).

Os vetores lentivirais (VL) são capazes de transduzir tanto células em divisão, como as que não estão em divisão (Ex: Neurônios), fazendo destes os candidatos preferidos para aplicações em ações no sistema nervoso. Vetores lentivirais podem acomodar longas sequências de DNA (mais do que 7,5 kb) (YACOUB *et al.*, 2007), sendo menos imunogênico que os vetores adenovirais, tornando-se os vetores mais usados para aplicações em terapia gênica *ex-vivo*. Existem vetores lentivirais mais complexos, baseados no HIV-1, contendo seis genes acessórios (*tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* e *vif*). Ainda que esses vírus causem doenças em humanos, os vetores baseados em seus genomas não conseguem se replicar quando usados em terapia gênica. Para isto, células utilizadas para a produção de partículas virais são geralmente transfectadas com plasmídeos em separado, codificando o gene de *env* ou outros genes que estão deletados no vetor de expressão de shRNA (NALDINI *et al.*, 1996).

A estratégia mais avançada e mais segura corresponde construção de vetores de auto-inativação (AIN). Neste caso, a região U3 UTR é deletada, e um promotor heterólogo (como o CMV, por exemplo) garante a transcrição do RNA de todo o vetor. Essa estratégia exclui qualquer risco de reiniciar replicação competente, do tipo original.

Assim como outros retrovírus, os vetores lentivirais são passíveis de serem pseudotipados. Por exemplo, podemos envelopar a partícula viral com o envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) ao invés da expressão de *env*, mudando o tropismo e suportando a entrada em células refratárias, tais como células hematopoiéticas ou células-tronco embrionárias (CHANG; SADELAIN, 2007).

Os VL são comumente utilizados para transferência de sequências que expressam shRNA. Atualmente, a transferência é tão eficiente que várias companhias ofertam esta metodologia para experimentos *in vitro*. Após 10 anos, várias adaptações e novas técnicas têm surgido, para melhorar as condições da transferência e expressão, levando os cientistas à elaboração e instalação de ótimos sistemas experimentais.

Exemplos do uso de vetores lentivirais com sistema de transferência e expressão de shRNA são inúmeros. Em alguns casos, os vetores lentivirais têm sido empregados com sucesso na inibição de genes regulatórios no cérebro, após a injeção local de tais vetores (BAHI *et al.*, 2005; DITTGEN *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2002). Em experimentos clínicos, uma aplicação para o uso de vetores lentivirais é a

utilização, *ex vivo*, na transferência e expressão de shRNA em células-tronco hematopoiéticas coletadas em pacientes infectados por HIV. As células transduzidas podem ser recolocadas em circulação no paciente, apresentando benefícios terapêuticos *in vivo* (MORRIS; ROSSI, 2006). Os VL têm sido bem utilizados na criação de animais transgênicos, porém uma desvantagem é o fato de os vetores serem inativados após longo tempo de manutenção da cultura de células. Várias revisões diferentes nos mostram exaustivas sugestões em grandes detalhes (MANJUNATH *et al.*, 2009; SINGER; VERMA, 2008; SUMIMOTO; KAWAKAMI, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células

A linhagem de células de fibroblastos de felinos (CrFK) e uma linhagem de células de humanos (293T) foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) contendo Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e penicilina/estreptomicina (GIBCO) a 1% em estufa com atmosfera úmida de 5% de CO₂. A linhagem de células linfóides cronicamente infectadas por FeLV, EECC (3201-EECC) foram mantidas em meio contendo RPMI 1640 (45%) e Leibovitz's L-15 (45%), acrescido de Soro Bovino Fetal (SBF) a 10% e penicilina/estreptomicina (GIBCO) a 1% em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO₂. As células CrFK foram gentilmente doadas por Dr. Looney (Universidade de San Diego, Califórnia, Estados Unidos), enquanto as outras células foram obtidas do repositório do NIH AIDS reagents.

3.2. Plasmídeos

Plasmídeos para a expressão de FeLV (pEECC) e para expressão de GFP (pCG-GFP) foram gentilmente doados pelo NIH AIDS reagents e por Dr. Frank Kirchoff (Hospital Universitário de Ulm, Alemanha), respectivamente. A Tabela 3 lista os plasmídeos utilizados neste trabalho.

O “design” e síntese (Invitrogen) das sequências alvos (F1, F2 e F3) (Tabela 4) relacionadas ao gene *gag* de FeLV, linhagem Rickard, subgrupo A (Número de acesso no GenBank: AF052723) foram realizados de acordo com publicações anteriores (ELBASHIR *et al.*, 2001). A Tabela 4 mostra as sequências no sentido senso, direcionadas ao gene *gag* de FeLV. Os oligonucleotídeos sintetizados foram anelados e clonados no vetor pSUPER (Figura 7) nos sítios de restrição para as enzimas BglIII e HindIII (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002), gerando os vetores pH1-F1, pH1-F2 e pH1-F3. Um controle (pH1-GFP) usado em outros trabalhos anteriores (HWA KIM *et al.*, 2005; TISCORNIA *et al.*, 2003) contra a proteína verde fluorescente (GFP) foi utilizado (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002; ELBASHIR *et al.*, 2001; WIZNEROWICZ; TRONO, 2003).

Tabela 3. Plasmídeos e seus produtos. Lista de plasmídeos utilizados neste trabalho, relacionados com sua respectiva função.

Plasmídeo	Produto (Função)
pCG-GFP	Expressão de GFP.
pEECC	Expressão de FeLV.
pSUPER	Vetor para clonagem de oligonucleotídeos para expressão de shRNA.
pH1-F1	Vetor de expressão de shRNA baseado na sequência F1.
pH1-F2	Vetor de expressão de shRNA baseado na sequência F2.
pH1-F3	Vetor de expressão de shRNA baseado na sequência F3.
pH1-GFP	Vetor de expressão de shRNA contra GFP.
pNL-SIN-CMV-BLR	Vetor lentiviral para expressão de shRNA, com resistência a blastocidina.
pcRev,	Plasmídeo para expressão de Rev.
pcTat	Plasmídeo para expressão de Tat.
pHIT/G	Plasmídeo para expressão do envelope de VSV-G.
pNL-H1-F2	Vetor lentiviral para expressão de shRNA baseado na sequência F2.
pNL-H1-GFP.	Vetor lentiviral para expressão de shRNA para GFP.
pNL-H1	Vetor lentiviral contendo o promotor H1, porém sem sequência para expressão de shRNA.

O fragmento de DNA contendo o promotor H1 e as sequências específicas para expressar shRNA foram excisadas do vetor pSUPER via digestão enzimática com *Clal* e *XbaI* (Figura 7), conforme instruções do fabricante do vetor, sendo então subclonadas nos mesmos sítios presentes no vetor lentiviral pNL-SIN-CMV-BLR (Gentilmente cedido pelo Dr. Bryan R. Cullen, Universidade de Duke, Carolina do Norte, Estados Unidos) (GOTTWEIN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2003; WÄLDELE *et al.*, 2006), gerando os vetores pNL-H1-F2 e o pNL-H1-GFP. Um vetor contendo apenas o promotor H1, sem precursor de shRNA, denominado de pNL-H1, foi gerado em paralelo, como controle negativo.

Tabela 4. Sequências alvo para o gene *gag* de FeLV e suas posições correspondentes no genoma de FeLV-A.

Identificação	Sequência alvo	Posição no genoma de FeLV-A (nt)
F1 – Senso	5' – GGTAAGCAGGTTGTACAAGG – 3'	1911 - 1931
F2 – Senso	5' – GCAGCTAGTGTATACTATCC – 3'	2020 - 2040
F3 – Senso	5' – GCAAGCAGCTAGTGTATACT – 3'	2016 - 2036

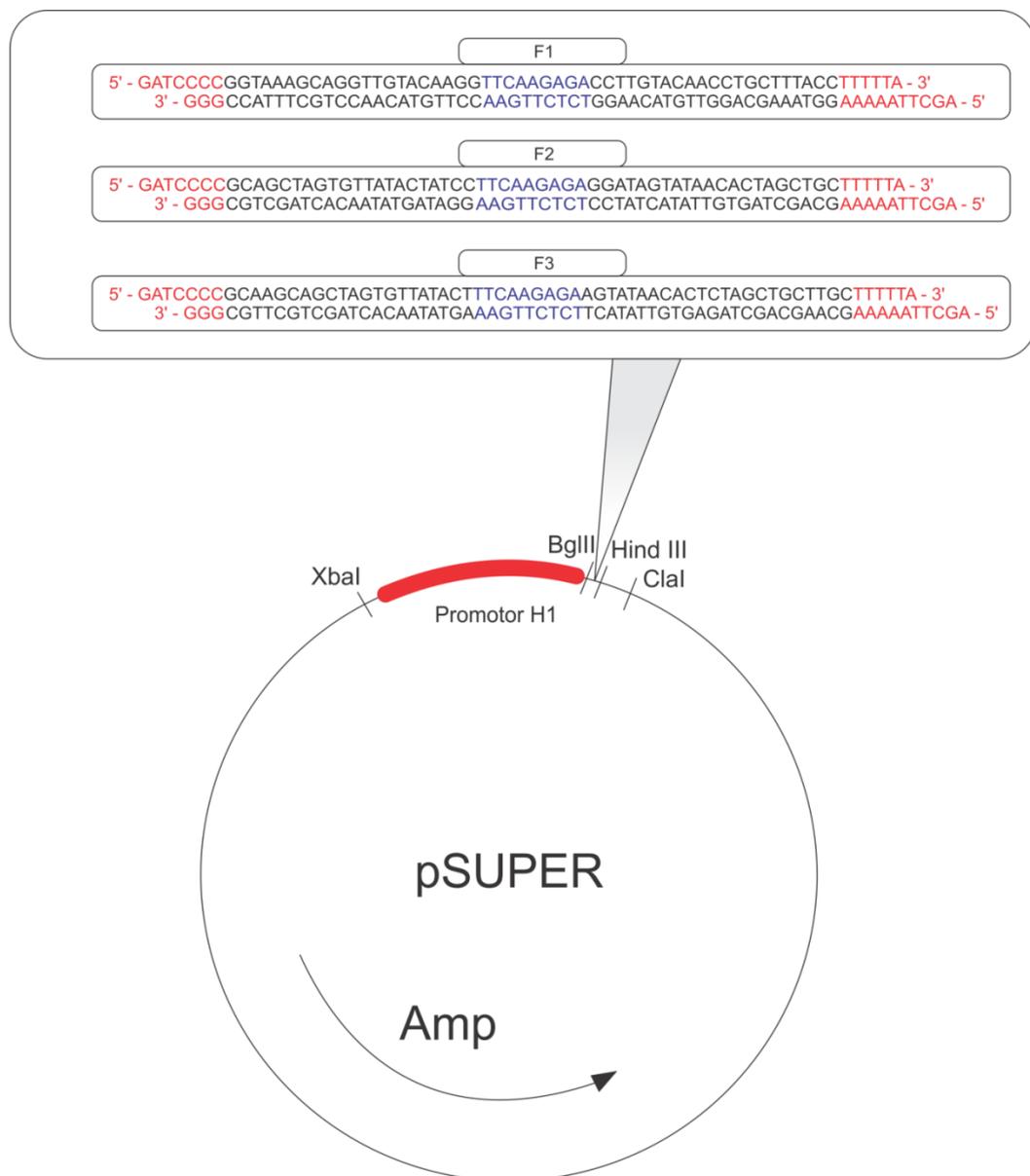


Figura 7. Clonagem no vetor pSUPER. Desenho esquemático do processo de inserção dos oligonucleotídeos contendo sequências alvo para produção de shRNA no vetor pSUPER. Os oligonucleotídeos foram anelados e clonados nos sítios para BglIII e HindIII.

3.3. Transfecção de células CrFK

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para cada reação, 5 µg de DNA plasmideal (Quantidade total) foram diluídos na mistura de 125 µl de água destilada e 125 µl de CaCl₂ 0,5M. Paralelamente, para a formação dos cristais de fosfato de cálcio, a solução contendo o DNA plasmideal era acrescentada gota a gota a 250 µl de uma solução 2X HBS (NaCl 280 mM; KCl 10 mM; Na₂HPO₄ 1,5 mM; Dextrose 12 mM; Hepes 50 mM) sob agitação. Finalmente, a solução de transfecção era espalhada gota a gota sobre a camada de células. Após 16 horas da transfecção, o meio de cultura era removido e então se adicionava meio de cultura novo. Após 48 horas da transfecção, as células eram ressuspensas em PBS 1X, lisadas e submetidas à análise.

Células CrFK foram co-transfectadas com 0,5 µg de pEECC-FeLV (NIH AIDS reagentes) e 3,5 µg de pH1-F1, pH1-F2, pH1-F3 ou pH1-GFP, respectivamente, através da utilização do método de precipitação por fosfato de cálcio descrito acima (GRAHAM, F., 1973). Para isto, 2 x 10⁵ células por poço (9,6 cm²), foram incubadas em meio DMEM em placas de seis poços por 24 horas. O meio de cultura foi trocado após 16 horas e o sobrenadante coletado após aproximadamente 48 horas da transfecção. Após a coleta, as células foram lisadas e a eficiência do shRNA analisada via detecção da expressão de p27 por Immunoblot ou ensaio de RT.

3.4. Análise por Immunoblotting

As células CrFK foram ressuspensas após 48 horas da transfecção e incubadas em tampão de lise (10 mM Tris–Cl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100). Trinta microgramas das proteínas totais obtidas foram separados via eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond P, GE Healthcare, Wien) e então bloqueadas por oito horas com leite desnatado a 5% em TBS-T (20 mM Tris–Cl [pH 7.6], 280 mM NaCl, 0.1% Tween-20). Após isto, foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com anticorpo produzido em cabra contra p27 de FeLV (diluído na proporção de 1:2000; Repositório NCI) ou anti-GAPDH, produzido em camundongo, (diluído na proporção de 1:500 em TBS-T contendo 5% de leite

desnatado; FL-335; Santa Cruz Biotechnology). Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente com anticorpo anti-cabra ou anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina (diluído em TBS-T 1:1000; abcam). A detecção da proteína foi realizada utilizando a solução de estoque NBT/BCIP (ROCHE) de acordo com as informações do fabricante. Para a interpretação dos dados do Immunoblotting, foi realizada análise densitométrica utilizando o software ImageJ (NIH).

3.5. Preparação de estoque viral e transdução de células

Vetores lentivirais baseados em HIV-1 (pNL-SIN-CMV-BLR) para expressão de shRNAs foram produzidos via co-transfecção de células 293T com 1,8 µg de vetores lentiviral, 0,1 µg de pcRev, 0,1 µg de pcTat e 50 ng de pHIT/G via precipitação por fosfato de cálcio (LEE, M.-T. M. *et al.*, 2003). O meio de cultura foi trocado após 16 horas e o sobrenadante removido aproximadamente 48 horas pós transfecção, sendo então filtrado em filtro de seringa (0,45 µm, Milipore). O RNA retroviral foi mensurado via ensaio de RT.

Células estabelecidas de felinos cronicamente infectados com FeLV, 3201-EECC, foram adicionadas em poços de placas de 12 cavidades (2×10^5 células/poço) e inoculadas com vetores lentivirais em multiplicidade de infecção (MOI) de 10 em volume final de 1 ml de RPMI 1640 (45%), Leibovitz's L-15 (45%) suplementado com SBF a 10%, termicamente inativado, e penicilina/estreptomicina a 1% (GIBCO). Após incubação a 37°C por 48 horas, as células foram lavadas com PBS e então cultivadas na presença de 8 µg/ml de blastocidina (Sigma) por 15 dias para a geração de células transduzidas estáveis.

3.6. Ensaio de transcriptase reversa (RT)

Os experimentos foram realizados em triplicata, em que as partículas de FeLV foram precipitadas e concentradas com polietileno glicol (PEG 6000). Inicialmente, as células 3201-EECC foram centrifugadas a 250 x g por 10 minutos, para remoção dos restos celulares. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 2000 x g por 30 minutos. Sequencialmente, 1 ml da solução de PEG foi adicionado para cada 2 ml de sobrenadante e então incubado por 8 horas a 4°C. O "pellet" contendo vírions foi

obtido por centrifugação a 800 x g por 45 minutos e então estocados a -60 °C. Todos os processos de centrifugação foram feitos a 4°C. Os víriões foram lisados usando solução de Triton X-100 (concentração final de 1%) em meio RPMI suplementado com 10% de SBF. A mensuração das unidades de RT foi realizada utilizando o kit EnzCheck de ensaio de RT (Invitrogen). O Kit de ensaio para transcriptase Reversa (EnzChek ®) corresponde a uma forma eficiente para medir a atividade da transcriptase reversa. Este método é baseado no reagente PicoGreen ® responsável pela quantificação de DNA de dupla fita ou RNA-DNA. No ensaio de atividade de transcriptase reversa, uma amostra biológica gera longas cadeias híbridas de RNA-DNA a partir de uma mistura de uma cadeia poli (A) que serve como fita molde, juntamente com um iniciador oligo-dT e dTTP. As cadeias híbridas de RNA-DNA formadas são então detectadas pelo reagente PicoGreen. As amostras foram mensuradas após aproximadamente uma hora, em leitor de microplacas fluorímetro apropriado para fluoresceína (FITC).

3.7. Citometria de fluxo

A expressão da proteína verde fluorescente (GFP) foi analisada via citometria de fluxo em FACS Calibur (Becton Dickinson, Palo Alto, CA), através da detecção em *log* no canal FL1 correspondente à detecção de intensidade de fluorescência. Como parâmetros, foram utilizados no mínimo 10.000 eventos coletados pelo equipamento, onde foram analisados via software CellQuest (BD Biosciences).

3.8. Microscopia de fluorescência

As células foram observadas diretamente ao microscópio de fluorescência, após lavagem com PBS 1X. As células foram observadas sob aumento de 40x.

3.9. Análises estatísticas

A significância estatística foi conferida através da análise da variância (ANOVA), utilizada no teste para observar diferenças significativas na quantificação de RT. Em caso de haver diferenças significativas, realizou-se o teste t de estudante

(Student's t-test), para determinar quais pares mostraram diferença. A significância estatística foi realizada e validada quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da inibição da expressão de GFP em células CrFK via expressão de shRNA

Com o intuito de confirmar a eficiência do sistema de RNAi, realizou-se a co-transfecção de células CrFK com um vetor para expressão de shRNA contra GFP (pH1-GFP) e um plasmídeo expressando GFP (pCG-GFP). A intensidade de GFP foi mensurada via citometria de fluxo (Figura 8), mostrando que a expressão de shRNA via promotor H1 é possível em células de felinos, havendo sensível redução de células apresentando GFP (1,25%) (Figura 8C) quando comparado com células que foram transfectadas apenas com o vetor expressando GFP (100%) (Figura 8B).

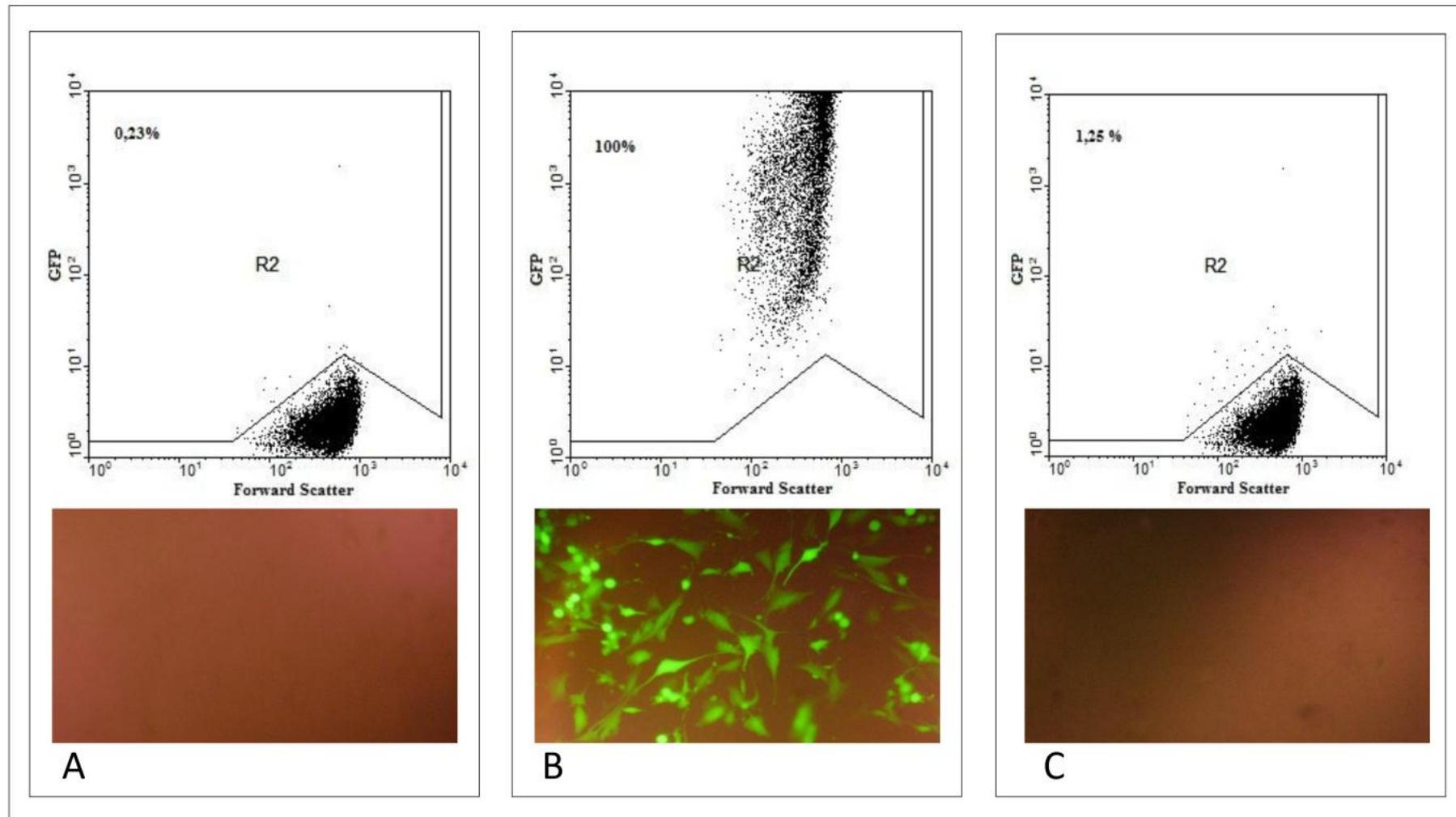


Figura 8. Validação do sistema de expressão de shRNA em células de felinos. A eficiência do sistema de expressão e silenciamento gênico via RNA de interferência foi checado via co-transfecção de células CrFK com vetores expressando shRNAs contra GFP e um vetor para expressão de GFP (pCG-GFP). Os níveis de fluorescência foram mensurados via citometria de fluxo, sendo confirmados via microscopia de fluorescência. A) Células transfectadas apenas com o vetor de expressão de shRNA (pH1-GFP); B) Células transfectadas com vetor expressando GFP (pCG-GFP); C) Células co-transfectadas com vetor expressando shRNA contra GFP (pH1-GFP) e vetor para expressão de GFP (pCG-GFP).

4.2. Inibição da expressão da proteína p27 em células CrFK transfectadas

A atividade das três sequências alvo homólogas para o gene *gag* de FeLV (F1, F2 e F3) foi conferida através da observação da expressão de p27 em células CrFK expressando FeLV-ECC. Uma sequência alvo para GFP foi utilizada como controle.

A análise via Immunoblotting realizada nos extratos protéicos das células, após 48 horas da transfecção, mostrou redução da expressão de p27 quando transfectadas com os vetores pH1-F1 e pH1-F2, quando comparadas ao controle pH1-GFP (Figura 9). Dentre as três sequências para a expressão de shRNA contra FeLV, pH1-F2 demonstrou significativa inibição na expressão de p27 em CrFK. A concentração de p27 de FeLV foi mensurada via densitometria. A análise desintométrica quantificou a redução de p27 após a co-transfecção com vetores expressando shRNA contra *gag* e um plasmídeo expressando FeLV (pEECC), exibindo forte redução na expressão da proteína p27 quando a sequência F2 é utilizada, mostrando 1,8 unidades ($\pm 0,38$) para pH1-F2 co-transfectadas com pEECC vs. 8,46 unidades ($\pm 1,12$) quando co-transfectadas com pH1-GFP e pEECC ($p < 0,005$) (Figura 10).

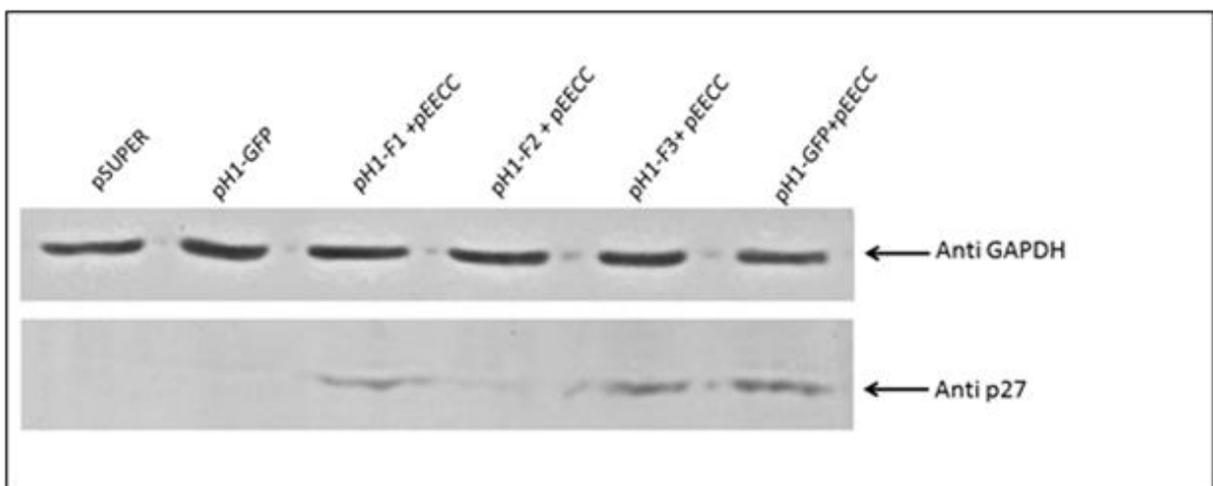


Figura 9. Immunoblotting da inibição da expressão da proteína p27. Efeito da expressão de shRNA na produção da proteína p27 em células CrFK/FeLV. Regulação da expressão da proteína p27 em células CrFK transfectadas com o plasmídeos pEECC e vetores expressando shRNA contra o gene *gag*. Um vetor para a expressão de shRNA contra GFP foi usado como controle. A análise por immunoblotting foi realizada com anticorpo policlonal contra p27 e anticorpo monoclonal contra GAPDH (controle). A primeira linha corresponde aos níveis de GAPDH nas células, enquanto que a segunda linha corresponde ao nível de p27. O nível de p27 é reduzido na presença dos vetores pH1-F1 e pH1-F2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

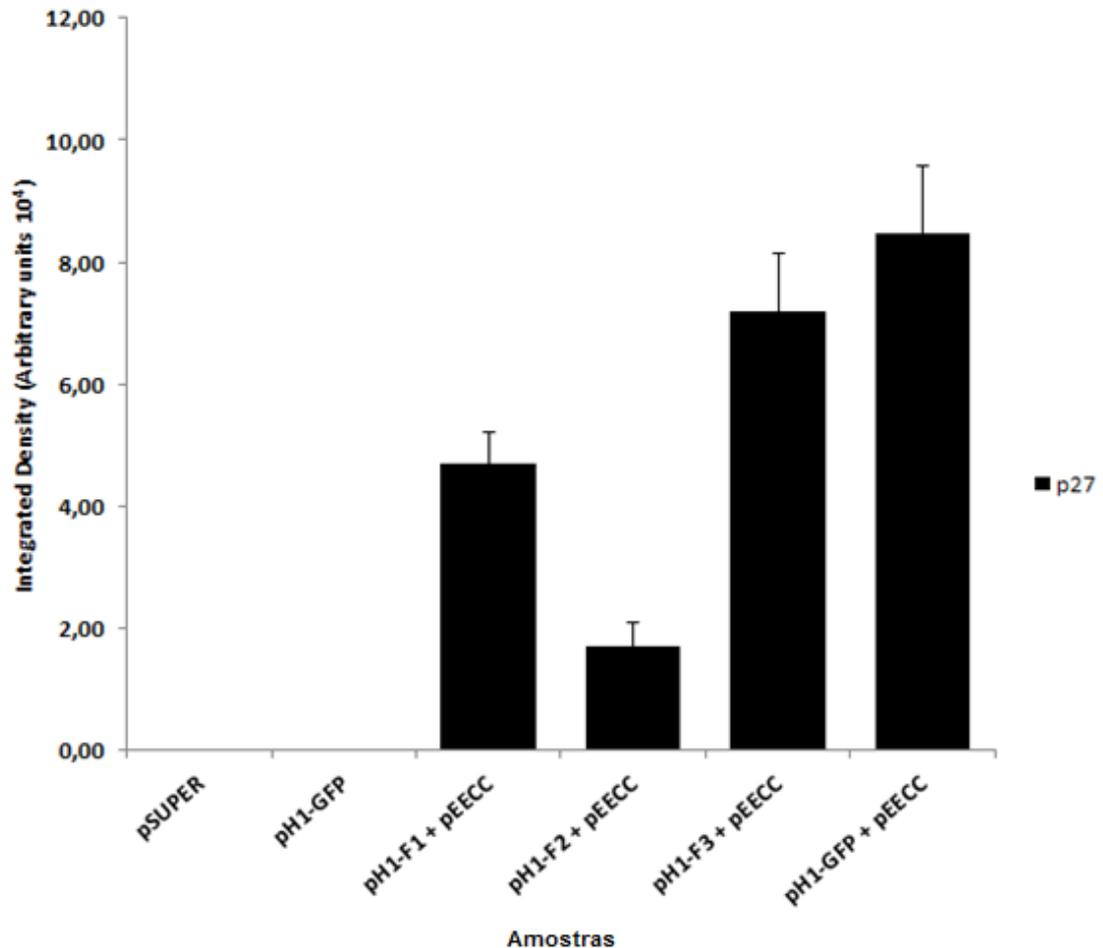


Figura 10. Densitometria do Immunoblotting da inibição da expressão da proteína p27. Análise densitométrica da expressão de p27. O nível da proteína p27 foi determinado via análise por immunoblotting e a quantificação foi expressa em unidades arbitrárias ($\times 10^4$) de densidade integrada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3. Efeito da expressão de shRNA contra a replicação de FeLV em células CrFK transfectadas

O efeito inibitório de shRNAs contra FeLV na replicação viral em células CrFK foi conferido via mensuração de atividade de RT no sobrenadante de células co-transfectadas com pEECC e pH1-GFP (Controle) ou pH1-F1 ou pH1-F2, uma vez que F3 não apresentou efeito considerável no experimento anterior. Células co-transfectadas com pH1-F2 mostraram significativa redução na quantidade de unidades de RT em relação às células que não receberam vetores expressando shRNA contra FeLV, 0,25 ($\pm 0,05$) vs. 0,84 ($\pm 0,12$) unidades de RT, respectivamente e 0,41 ($\pm 0,07$) unidades de RT para células co-transfectadas com pH1-F1 ($p < 0,05$) (Figura 11). Estes resultados indicam que os shRNAs contra o

gene *gag* de FeLV podem inibir de forma específica a replicação viral do FeLV proveniente de células transfectadas.

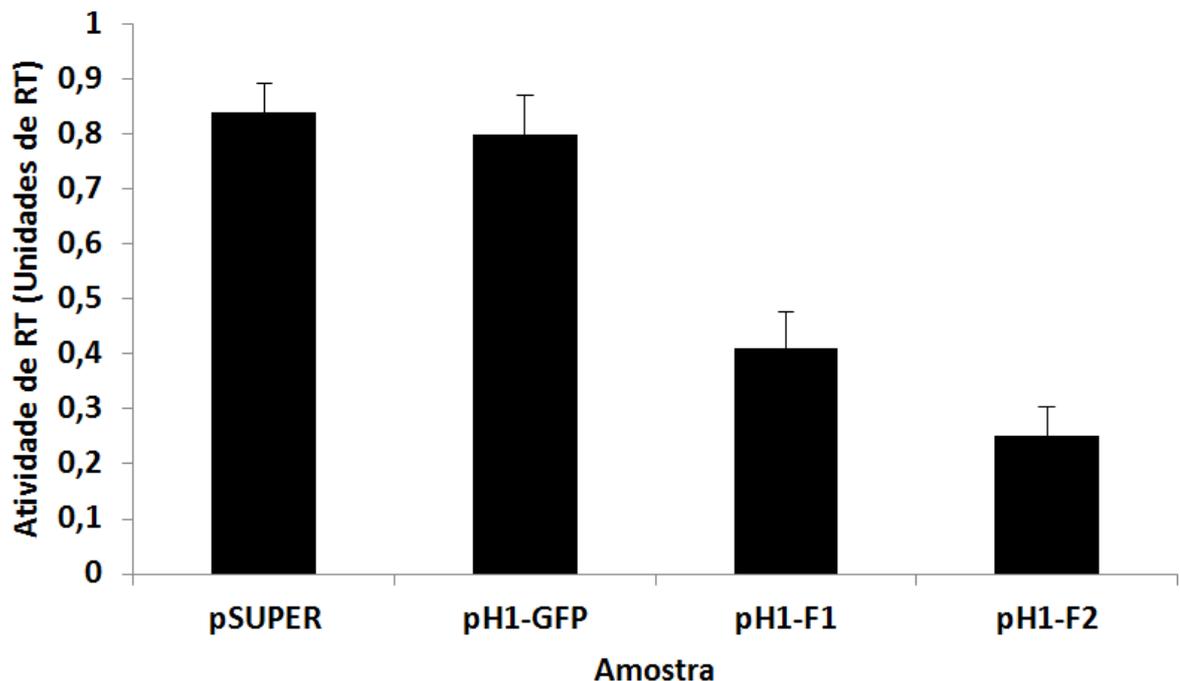


Figura 11. Efeito da expressão de shRNA no brotamento de FeLV em células CrFK. A atividade de RT no sobrenadante da cultura de células foi mensurada após 48 horas após a co-transfecção com vetor de expressão para shRNA e vetor pEECC. As linhas presentes nas colunas correspondem ao desvio padrão obtidos em experimento em triplicata, respectivamente. Uma sequência alvo para GFP foi utilizada como controle (pH1-GFP).

4.4. Efeito da expressão de shRNA específicos para FeLV, mediada por vetor lentiviral, na replicação viral em células 3201-EECC

A eficiência da transferência e expressão de shRNA, mediada por vetor lentiviral, contra a replicação de FeLV, foi investigada na replicação em células T cronicamente infectadas (3201-EECC). As células expressando shRNA foram obtidas após a inoculação de partículas lentivirais pseudotipadas com VSV-G e então selecionadas via presença de blastocidina. A replicação de FeLV nestas células foi examinada após 15 dias da inoculação com os vetores lentivirais.

A atividade de RT foi mensurada no sobrenadante de células transduzidas com vetores lentivirais contendo sequências para a expressão de shRNA específicos para FeLV (shF2), mostrando redução significativa na atividade de RT, 0,86 ($\pm 0,11$) unidades vs. 3,04 ($\pm 0,16$) unidades presentes em células não tratadas com os vetores contra FeLV ($p < 0,05$) e 2,41 ($\pm 0,28$) em células infectadas com vetores

lentivirais contendo apenas o promotor H1 (shH1), utilizado como controle (Figura 12).

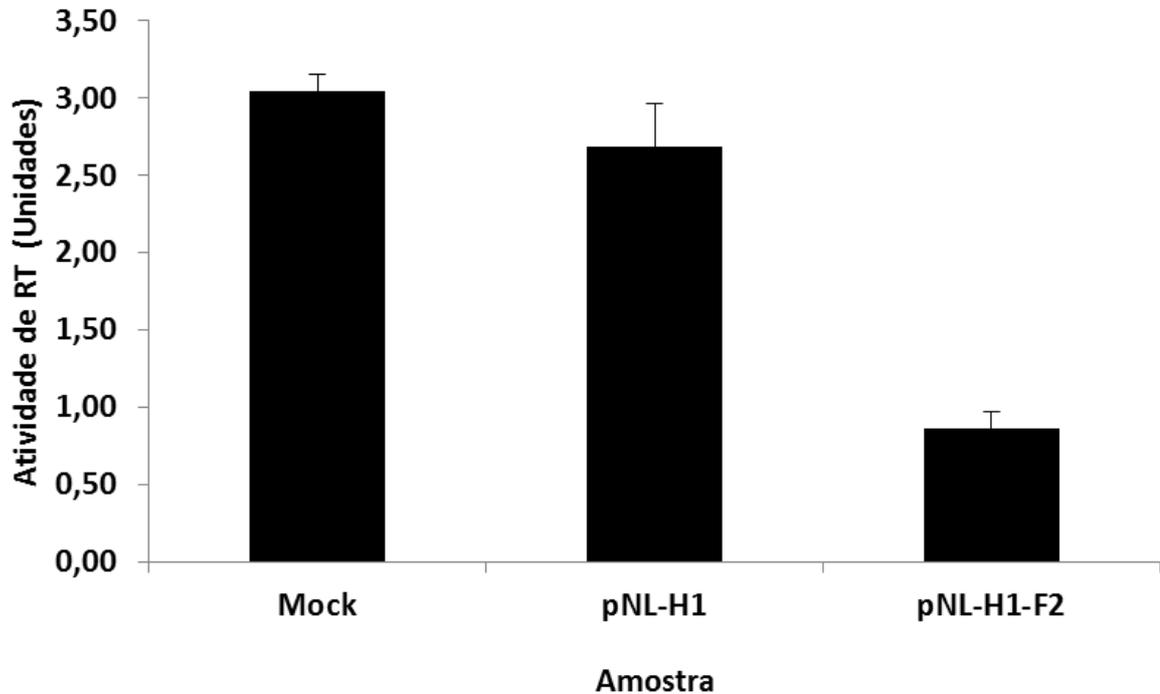


Figura 12. Efeito da transferência e expressão de shRNA contra FeLV, via vetor lentiviral, na replicação de FeLV em células 3201-EECC. células foram transduzidas com vetores lentivirais, os quais expressavam shRNA (Sequência alvo F2) ou apenas o promotor H1 e então submetidas a meio contendo blastocidina. A atividade de RT no sobrenadante da cultura de células foi mensurada 15 dias após a transdução mediada pelo vetor lentiviral. As linhas presentes nas colunas correspondem ao desvio padrão obtido em triplicatas, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Desde que a tecnologia do RNAi foi desenvolvida, vários genes de organismos eucariontes, procariontes e vírus têm sido estudados e utilizados como possíveis ferramentas terapêuticas para infecções virais e doenças que ocorrem em humanos, despertando grande entusiasmo em possível utilização clínica para tratamento de diversas doenças que acometem humanos, plantas e animais. Com o avanço da tecnologia nos últimos anos, a identificação de novos genes e a descrição mais precisa de muitas doenças, vêm à tona com informações sobre a patogenia e processos referentes a relação do parasita e o hospedeiro, abrindo a oportunidade de intervenção, e em algumas vezes a cura da doença estudada. Muitas doenças de etiologia viral, bacteriana, fúngica, por protozoários e príons, estabelecem relações moleculares com as células do hospedeiro, a fim de garantir o sucesso da infecção e, portanto, a sobrevivência e perpetuação do parasita. São essas interações moleculares, que muitas vezes abrem a possibilidade de interferência por parte de medicamentos e estratégias moleculares, tão como a utilização de anticorpos, que permitem a cura destas doenças.

Desde a identificação dos agentes infecciosos, os pesquisadores buscam formas de evitar ou debelar infecções por parte do patógeno, porém muitas vezes nosso organismo desenvolve resistência contra os mesmos, passando a conviver de forma pacífica com tais parasitas, estabelecendo relações simbióticas. Essa resistência em quase sua totalidade pode ser atribuída ao nosso sistema imunológico, que à medida que entra em contato com o agente infeccioso adquire memória imunológica e estabelece formas eficientes de combate. No entanto, nos deparamos com a identificação de mecanismos moleculares de regulação gênica que podem interferir nos processos de patogenia do agente infeccioso (SCHOPMAN *et al.*, 2010) ou de defesa do hospedeiro (KANZAKI *et al.*, 2008), que eventualmente levam ao controle da infecção. Este cenário possibilita a idealização de diversas estratégias de combate para a mais variada gama de patógenos.

Neste trabalho, mostramos pela primeira vez que é possível utilizar a interferência por RNA na redução do processo infeccioso de FeLV em células de felinos. Estes resultados abrem nova perspectiva na busca pela cura, ou redução da síndrome que decorre da infecção por FeLV em gatos.

Os vírus correspondem a agentes infecciosos microscópicos com material genético envolto e protegido por estrutura proteica denominada de capsídeo. Parasitas intracelulares obrigatórios, não conseguem se replicar em ambiente extracelular e, portanto, necessitam do metabolismo da célula infectada. Altamente específicos, os vírus parasitam células determinadas no organismo do hospedeiro, via compatibilidade molecular. Uma vez no interior da célula, interferem no metabolismo e alteram a dinâmica celular, levando-a muitas vezes, a sua degradação, fato que em vários casos culmina com a morte do hospedeiro. Em muitos tipos de vírus, a infecção promove a sensibilização do hospedeiro e consequente degradação do patógeno por parte do sistema imunológico. No entanto, alguns vírus conseguem invadir as células responsáveis pela defesa do organismo desencadeando o estabelecimento de síndrome de imunodeficiência por parte do hospedeiro infectado. Essa redução na imunidade do indivíduo pode levar à ativação contra organismos antes inofensivos e de sequências gênicas do hospedeiro, e sequencialmente o surgimento de doenças no indivíduo infectado, causando-lhe sérios problemas e até a morte. Em todo caso, mecanismos que consigam debelar a infecção no interior da célula são de extrema importância para que possamos reduzir o potencial infeccioso do vírus em sua rota intracelular prestes a se replicar.

Os felídeos ou felinos (latim científico: *Felidae*) correspondem a família de mamíferos digitígrados, da ordem dos carnívoros, na qual o animal domesticado é o gato. Assim como os outros grupos de animais, os felinos apresentam diversos tipos de bactérias, fungos, protozoários e vírus, que os parasitam, causando os mais variados tipos de doenças. Os felinos apresentam um tipo de vírus que causa imunodeficiência (FIV) adquirida, assim como os humanos (HIV) e os símios (SIV), levando à redução da imunidade e muitas vezes a morte dos mesmos. Além destes, os felinos são susceptíveis à infecção por vírus com tropismo por células do sistema hematopoiético (FeLV), capazes de gerar linfomas e leucemias, similarmente como ocorre com o HTLV (Vírus linfotrófico de células T humanas) no homem (JARRETT *et al.*, 1964).

A busca por terapias contra essas e outras infecções virais tem levado nas últimas décadas a gasto significativo de recursos financeiros. Tal investimento tem possibilitado aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos indivíduos infectados de forma considerável, permitindo em muitas vezes proporcionar vida quase normal.

Muitas destas conquistas se deve ao avanço tecnológico na identificação de mutações e susceptibilidade dos vírus a determinadas moléculas que reprimem a infecção ou replicação do vírus no interior da célula.

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV) infecta células de felinos, causando o desenvolvimento de neoplasias malignas como leucemia e linfomas. O vírus geralmente é transmitido pelas vias aéreas superiores, estabelecendo-se em órgãos linfáticos atingindo o tecido hematopoiético do animal, levando a profunda alteração na homeostase do animal, e em muitos casos à morte. Diante deste quadro, muitos pesquisadores procuram formas de reduzir o potencial infeccioso do vírus ou então aumentar a capacidade de proteção do animal. No entanto, ainda não apresentamos no cenário atual arsenal de medicamentos ou estratégias de combate que leve a cura por parte do hospedeiro infectado.

A inibição da replicação de vírus como o HIV-1 e o FIV, dentre outros vírus, pode ser obtida via expressão de shRNA em linhas de células estabelecidas (BABA *et al.*, 2007, 2008; JACQUE *et al.*, 2002; KANZAKI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2011; ZHOU; ROSSI, JOHN J, 2011; ZHOU *et al.*, 2011). Neste trabalho, investigou-se a viabilidade do uso da tecnologia do RNAi, baseada na expressão de shRNA, visando o controle da infecção por FeLV em linhagens de células de felinos. O estudo demonstrou a potencialidade da tecnologia de RNAi em possível estratégia para o controle da infecção por FeLV. Também demonstrou que é possível reduzir a replicação de FeLV *in vitro*, via tecnologia de RNAi. Vetores lentivirais expressando shRNA específicos contra sequências do gene *gag* de FeLV foram desenvolvidos e o seu efeito foi examinado através da transdução em células de felinos.

A busca por sequências específicas no genoma de FeLV que possam servir de alvo para terapia gênica futura é altamente importante para que possamos controlar a infecção ou então debelar a infecção viral. A tecnologia do RNAi possibilita intervenção específica e eficiente contra agentes infecciosos virais, aumentando a possibilidade de sucesso em possíveis terapias *in vivo*, uma vez que age na inibição apenas do agente infeccioso, não causando alterações de grandes dimensões no metabolismo celular.

O promotor para a RNA polimerase III (Promotor H1) possibilita a produção endógena de shRNA em diversos tipos de células de vertebrados (Mi *et al.*, 2006). No entanto, não existem dados sobre FeLV na literatura, quanto a intervenções genéticas utilizando este promotor. Sendo assim, este trabalho se empenhou em

comprovar o modelo de inibição gênica via expressão de shRNA em células de felino. Para isso, utilizou-se um vetor empregado em outros trabalhos (pH1-GFP) (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002), que consegue inibir a expressão de GFP. Para averiguar tal fenômeno, utilizou-se a citometria de fluxo e a microscopia de fluorescência, demonstrando o funcionamento do sistema de silenciamento gênico em células de felinos, com redução de mais de 90% das células expressando GFP quando em presença do vetor para expressão de shRNA contra GFP (Figura 8). Tal comprovação é de suma importância, para demonstrar que não há fatores que possam interferir no sistema descrito para outras células de mamíferos, e que é possível a utilização do modelo no processo de inibição da expressão de proteínas em células de felinos.

No intuito de identificar a sequência alvo que apresenta eficiência na inibição da replicação de FeLV, averiguou-se o efeito de sequências homólogas ao gene *gag* de FeLV em células CrFK co-transfectadas (F1, F2 e F3) (Tabela 4). Três sequências alvo, homólogas ao gene *gag*, foram usadas para construir três vetores contra o clone FeLV-EECC (pH1-F1, pH1-F2 e pH1-F3), sendo co-transfectados juntamente com o plasmídeo pEECC em células CrFK. Observamos que a transfecção com vetores expressando shRNA contra FeLV (F1 e F2) resultaram na redução da expressão da proteína p27 (Figuras 9 e 10), tendo destaque para F2 que obteve redução de aproximadamente 80%. Além disto ocorreu redução na atividade de RT no sobrenadante da cultura de células (Figura 11), indicando que a região do gene *gag* de FeLV pode ser alvo para a ação do RNAi, tais como outros retrovírus como HIV e FIV, por exemplo, (BABA *et al.*, 2007, 2008; JACQUE *et al.*, 2002; KANZAKI *et al.*, 2008). A sequência utilizada neste trabalho (F2), que apresentou maior eficiência na inibição da replicação de FeLV, é bastante conservada em linhagens de FeLV (CHEN *et al.*, 1998).

O vetor expressando a sequência F3 contra FeLV falhou na redução da expressão da proteína p27, apesar da complementariedade com a sequência do gene *gag*. Vários fatores podem influenciar no mecanismo de RNAi contra FeLV, inclusive erros técnicos, apesar de que as sequências clonadas nos vetores foram sequenciadas e os experimentos foram realizados em triplicata. Em todo caso, a identificação de sequências que não apresentam eficiência está de acordo com a literatura (REYNOLDS *et al.*, 2004).

O ciclo de infecção celular do FeLV, como todo retrovírus, apresenta o estágio de entrada do vírus no citoplasma celular, transcrição reversa, integração, síntese de componentes virais, brotamento e maturação do vírus. O gene *gag* participa da produção de moléculas que formam o capsídeo viral, como por exemplo, p27. No caso de ausência da proteína, não ocorre à formação e brotamento de novas partículas virais. A redução, cerca de 70%, da atividade de RT no sobrenadante das células submetidas aos vetores para expressão de shRNA contra FeLV (Figura 11), demonstram que as sequências utilizadas neste trabalho, como F2, por exemplo, leva a brotamento viral ineficiente nas células submetidas ao tratamento com RNAi.

Existem variadas formas de se realizar a intervenção molecular via RNA de interferência (Figura 6). Algumas delas promovem a inserção de fragmentos de RNA de dupla fita no interior da célula, outros realizam a expressão de shRNAs e, por consequência, a interferência no processo de expressão gênica. Em todos os casos observamos uma via única que consiste na ligação ao complexo RISC e, por consequência, a redução ou inibição por completo da expressão do gene alvo. Assim como todo processo biológico, o RNAi não é definitivo e acaba tendo seu efeito finalizado após determinado período de tempo, perdendo a eficiência se não for novamente inserido ou expresso no interior da célula. Vetores plasmideais ou lentivirais com genes de resistência a determinados antibióticos estão sendo utilizados no estabelecimento de intervenções mais duradouras, porém em muitos casos ainda não são passíveis de serem utilizados para terapias clínicas devido a limitações tóxicas (BABA *et al*, 2008).

Os vetores lentivirais podem infectar tanto células em divisão como células que não estão em divisão, mudando a expressão de genes alvos, sendo capazes de provocar efeitos surpreendentes no estabelecimento de terapias baseadas nesses tipos de vetores (GIRY-LATERRIÈRE *et al.*, 2011). Sendo assim, examinou-se o efeito da expressão de shRNAs mediado pela transferência de vetores lentivirais em células T de felinos cronicamente infectadas, como realizada por outros autores em outros tipos de modelos virais (BABA *et al*, 2008; LEE *et al*, 2003). A atividade de RT presente no sobrenadante da linhagem de células 3201-EECC foi marcadamente reduzida em 15 dias após a transdução com vetores lentivirais expressando shRNA específico para FeLV (pNL H1-F2) (Figura 12). Esta redução da atividade de RT observada em linhagens de célula cronicamente infectadas por FeLV, 3201, suporta futuros usos desta ferramenta molecular na terapia gênica para FeLV. No entanto, o

escape viral do RNAi foi observado em outros sistemas virais (SCHOPMAN *et al.*, 2010; WESTERHOUT, 2005), apesar de que no sistema de FeLV o resultado pode ser diferente, haja vista que mudanças no genoma de FeLV deixam o vírus menos viável que outros retrovírus como FIV e HIV (DUNHAM; GRAHAM, 2008). Neste caso, o uso de shRNA pode possibilitar nova estratégia no tratamento de gatos infectados por FeLV.

Estudos anteriores demonstram que a expressão de shRNA apresenta efeito transitório em linhagens celulares de mamíferos com alta taxa de divisão celular (ELBASHIR *et al.*, 2001). Em outra análise, Song e colaboradores demonstraram que a inibição da replicação de HIV-1 em células primárias como macrófagos derivados de monócitos podem ter a presença do efeito inibidor do siRNA contra p24 de HIV durante até 15 dias. Como as células CrFK apresentam proliferação rápida, é plausível que o efeito pouco duradouro da expressão de shRNA pode ocorrer pela redução da concentração dos vetores de expressão na prole das células (SONG *et al.*, 2003).

A redução da atividade de RT no sobrenadante de células transduzidas com vetores lentivirais que expressam RNAi contra FeLV demonstra que a estratégia contra o gene *gag* também previne o brotamento viral e, por consequência, a sua presença no sobrenadante da cultura de células. Este resultado é de grande importância, haja vista que demonstra que pode evitar a saída do vírus do interior da célula e, portanto, previne a infecção de outras células que ainda não foram infectadas. Dados como este reforçam a hipótese de que o RNAi pode servir como fator protetor para células ainda não infectadas, assim como evitar a replicação viral e a dispersão por outras células. Vale lembrar que muitos resultados *in vitro* não podem ser extrapolados para sistemas *in vivo*, porém os dados sinalizam de forma positiva para resultado promissor em tal perspectiva.

A obtenção de resultados satisfatórios, como os apresentados neste trabalho, possibilita a idealização da utilização do RNAi *in vivo*, para a prevenção da infecção por FeLV em gatos susceptíveis a infecções, como gatos que circulam livremente em regiões endêmicas para FeLV. Outra possível utilização seria o tratamento de células coletadas de medula óssea de animais infectados com RNAi e a reimplantação das células nos animais, almejando a redução dos níveis virais, melhoria na qualidade de vida e possível cura dos animais submetidos ao tratamento.

Investigações futuras são necessárias para aumentar a eficiência da transdução com vetores lentivirais em células primárias de gatos. Em todo caso, células-tronco hematopoiéticas correspondem a células de interesse para terapia gênica com RNAi contra a infecção por FeLV. O desenvolvimento de estratégias para terapia gênica antirretroviral com estas células tem sido proposto para o tratamento da AIDS. Todavia, o sistema de isolamento e a purificação das células-tronco hematopoiéticas de felinos ainda não foi totalmente estabelecido, e, provavelmente após esta definição, a transferência e expressão de RNAi, via vetor lentiviral, contra a infecção por FeLV será relevante para o estabelecimento de terapia gênica em gatos infectados, em futuro não tão distante.

Outras investigações quanto à viabilidade da sequência F2 para os vírus circulantes no Brasil serão necessárias, uma vez que a sequência alvo necessita estar sem alterações para que o RNAi tenha efeito. Sendo assim, trabalhos epidemiológicos de identificação dos tipos de vírus circulantes são estritamente necessários para que possamos ter sucesso em intervenções clínicas futuras utilizando esta ferramenta molecular. Para isto, o sequenciamento dos genes *env* e *gag* são necessários para que possamos visualizar tal possibilidade de terapia gênica em animais presentes em nosso país utilizando as informações presentes neste trabalho.

O objetivo da estratégia de terapia genética para o controle da infecção por FeLV é produzir células hematopoiéticas resistentes a FeLV e/ou inibir a progressão da doença. Isto é altamente plausível, haja vista que a sequência F2 consegue inibir a replicação viral *in vitro* e provavelmente poderá ser usada na proteção de células contra a infecção. Frente a isto, pesquisas sobre o aumento da eficiência da transdução de vetores em células de felinos são necessárias.

O silenciamento gênico pelo mecanismo de RNAi requer perfeita complementariedade entre o shRNA e a sequência alvo, permitindo extrapolação dos resultados encontrados, apesar de que os ensaios clínicos podem apresentar resultados diferentes dos encontrados *in vitro*. Em todo caso, a eficácia das sequências utilizadas neste trabalho necessitam ser averiguadas para outras linhagens de FeLV além da linhagem Rickard utilizada. Todavia, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, a redução da infecção por FeLV através da tecnologia de RNAi, abrindo a oportunidade para a realização de experimentos na elaboração de possível modelo de terapia gênica para esta infecção/enfermidade.

6. CONCLUSÃO

Em suma, este trabalho demonstrou que a expressão de shRNA homólogos ao gene *gag* de FeLV inibiu de forma eficiente a expressão de p27 e a replicação de FeLV em células CrFK. Além disto, mostrou-se que a transferência e expressão de shRNA via vetores lentivirais pode inibir de forma específica a replicação viral em células linfóides cronicamente infectadas por FeLV. O estudo presente indicou que a tecnologia de RNAi pode ser útil para a elaboração de terapia gênica para o controle da infecção por FeLV.

Estes resultados reforçam a hipótese de que o RNAi seja no futuro uma ferramenta utilizada no combate à infecção por FeLV, uma vez que consegue inibir de forma específica a replicação de FeLV. A utilização de vetores lentivirais, assim como metodologias mais avançadas, pode possibilitar sucesso maior quanto à realização de terapia gênica utilizando as sequências descritas neste trabalho.

Muitas limitações ainda necessitam ser superadas quanto ao estabelecimento de tratamentos de animais infectados no Brasil, uma vez que não conhecemos ainda qual a realidade da infecção em animais que vivem no país. Dados epidemiológicos e genéticos necessitam ser gerados para que possamos ter resultados satisfatórios e mais interessantes para a comunidade acadêmica e a população em geral.

O uso de terapia gênica em animais não é, portanto, algo tão distante, porém requer estudos prévios para que não se submeta animais a testes que não irão trazer resultados importantes, que poderiam ser evitados com a busca por informações prévias.

REFERÊNCIAS

ABCD guidelines on Feline Leukaemia Virus. . [S.l: s.n.]. , 2007

ANDERSON, M. M.; LAURING, A. S.; BURNS, C. C.; OVERBAUGH, J. Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1828-1830, 2000.

ANDERSON, M. M.; LAURING, A. S.; ROBERTSON, S.; DIRKS, C.; OVERBAUGH, J. Feline Pit2 functions as a receptor for subgroup B feline leukemia viruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10563-10572, 2001.

ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I. *et al.* Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3448-3449, 2000.

BABA, K.; GOTO-KOSHINO, Y.; MIZUKOSHI, F. *et al.* Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. **The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 70, n. 8, p. 777-783, 2008.

BABA, K.; MIZUKOSHI, F.; GOTO-KOSHINO, Y. *et al.* Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 3-4, p. 207-216, 2007.

BAGLIONI, C.; MINKS, M. A.; CLERCQ, E. D. Structural requirements of polynucleotides for the activation of (2'-5')A_n polymerase and protein kinase. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 19, p. 4939-4950, 1981.

BAHI, A.; BOYER, F.; KOLIRA, M.; DREYER, J.-L. In vivo gene silencing of CD81 by lentiviral expression of small interference RNAs suppresses cocaine-induced behaviour. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 5, p. 1243-1255, 2005.

BARBACID, M.; STEPHENSON, J. R.; AARONSON, S. A. Evolutionary relationships between gag gene-coded proteins of murine and primate endogenous type C RNA viruses. **Cell**, v. 10, n. 4, p. 641-648, 1977.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BARTLETT, D. W.; DAVIS, M. E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 322-333, 2006.

BARTLETT, D. W.; DAVIS, M. E. Effect of siRNA nuclease stability on the in vitro and in vivo kinetics of siRNA-mediated gene silencing. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 909-921, 2007.

BODEN, D.; PUSCH, O.; SILBERMANN, R. *et al.* Enhanced gene silencing of HIV-1

specific siRNA using microRNA designed hairpins. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 1154-1158, 2004.

BRODERSEN, P.; VOINNET, O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. **Trends in Genetics: TIG**, v. 22, n. 5, p. 268-280, 2006.

BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5567, p. 550-553, 2002.

CAI, X.; HAGEDORN, C. H.; CULLEN, BRYAN R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 12, p. 1957-1966, 2004.

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7390-7394, 2006.

CHANG, A. H.; SADELAIN, M. The genetic engineering of hematopoietic stem cells: the rise of lentiviral vectors, the conundrum of the Itr, and the promise of lineage-restricted vectors. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 15, n. 3, p. 445-456, 2007.

CHANG, KENNETH; ELLEDGE, S. J.; HANNON, G. J. Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. **Nature Methods**, v. 3, n. 9, p. 707-714, 2006.

CHEN, H., BECHTEL, M.K., SHI, Y., PHIPPS, A., MATHES, L.E., HAYES, K.A., ROY-BURMAN, P. Pathogenicity induced by feline leukemia virus, Rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA). **J. Virol.** 72, 7048–7056, 1998.

CHENG, J. C.; MOORE, T. B.; SAKAMOTO, K. M. RNA interference and human disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, n. 1-2, p. 121-128, 2003.

CHUNG, K.-H.; HART, C. C.; AL-BASSAM, S. *et al.* Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 7, p. e53, 2006.

COFFIN, J. M. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. **The Journal of General Virology**, v. 42, n. 1, p. 1-26, 1979a.

COFFIN, J. M. Structure, Replication, and Recombination of Retrovirus Genomes: Some Unifying Hypotheses. **Journal of General Virology**, v. 42, p. 1-26, 1979b.

COFFIN, J. M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 176, p. 143-164, 1992.

COTTER, S. M. Anemia associated with feline leukemia virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 11, p. 1191-1194, 1979.

COUZIN, J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5602, p. 2296-2297, 2002.

COYNE, M. J.; REEVES, N. C.; ROSEN, D. K. Estimated prevalence of injection-site

sarcomas in cats during 1992. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 2, p. 249-251, 1997.

DAY, N. K.; ENGELMAN, R. W.; LIU, W. T.; TRANG, L.; GOOD, R. A. Remission of lymphoma leukemia in cats following ex vivo immunosorption therapy using Staphylococcus protein A. **Journal of Biological Response Modifiers**, v. 3, n. 3, p. 278-285, 1984.

DEVINCENZO, J.; LAMBKIN-WILLIAMS, R.; WILKINSON, T. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8800-8805, 2010.

DITTMER, T.; NIMMERJAHN, A.; KOMAI, S. *et al.* Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 52, p. 18206-18211, 2004.

DONNER, L.; FEDELE, L. A.; GARON, C. F.; ANDERSON, S. J.; SHERR, C. J. McDonough feline sarcoma virus: characterization of the molecularly cloned provirus and its feline oncogene (v-fms). **Journal of Virology**, v. 41, n. 2, p. 489-500, 1982.

DUNHAM, S. P.; GRAHAM, E. Retroviral infections of small animals. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p. 879-901, 2008.

ECHEVERRI, C. J.; BEACHY, P. A.; BAUM, B. *et al.* Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. **Nature Methods**, v. 3, n. 10, p. 777-779, 2006.

ECHEVERRI, C. J.; PERRIMON, N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 5, p. 373-384, 2006.

EIDEN, M. V.; TALIAFERRO, D. L. Emerging Retroviruses and Cancer. In: DUDLEY, J. (Org.). **Retroviruses and Insights into Cancer**. p. 307-333, 2010.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

ELLIS, L. M.; HICKLIN, D. J. Resistance to Targeted Therapies: Refining Anticancer Therapy in the Era of Molecular Oncology. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 24, p. 7471-7478, 2009.

ES, H. H. G. VAN; ARTS, G.-J. Biology calls the targets: combining RNAi and disease biology. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1385-1391, 2005.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FISCHER, N. Xenotropic Murine Leukemia Virus-related Gammaretrovirus in

Respiratory Tract. **Emerging Infectious Diseases**, 2010.

FLYNN, J N.; DUNHAM, S. P.; WATSON, V.; JARRETT, O. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 5, p. 2306-2315, 2002.

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

FOUGEROLLES, A. DE; VORNLOCHER, H.-P.; MARAGANORE, J.; LIEBERMAN, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, n. 6, p. 443-453, 2007.

FRANCIS, D. P.; COTTER, S. M.; HARDY, W. D., Jr; ESSEX, M. Comparison of virus-positive and virus-negative cases of feline leukemia and lymphoma. **Cancer Research**, v. 39, n. 10, p. 3866-3870, 1979.

GINGERICH DA. Lymphocytic T-cell immunomodulator (LTCl): Review of the immunopharmacology of a new veterinary biologic. **Intern J Appl Res Vet Med.**, v. 6(2), p. 61-68, 2008.

GIRY-LATERRIÈRE, M.; VERHOEYEN, E.; SALMON, P. Lentiviral vectors. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 737, p. 183-209, 2011.

GOTTWEIN, E.; MUKHERJEE, N.; SACHSE, C. *et al.* A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 1096-1099, 2007.

GRAHAM, F. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52, n. 2, p. 456-467, 1973.

GRANT, C. K.; ESSEX, M.; GARDNER, M. B.; HARDY, W. D., Jr. Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. **Cancer Research**, v. 40, n. 3, p. 823-829, 1980.

GRIMM, D.; KAY, M. A. Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. **Gene Therapy**, v. 13, n. 6, p. 563-575, 2006.

HALDER, J.; KAMAT, A. A.; LANDEN, C. N., Jr; *et al.* Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 16, p. 4916-4924, 2006.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARBOUR, D. A.; GUNN-MOORE, D. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J. *et al.* Protection against oronasal challenge with virulent feline leukaemia virus lasts for at least 12 months following a primary course of immunisation with Leukocell 2 vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 23-24, p. 2866-2872, 2002.

HARDY, W. D., Jr; GEERING, G.; OLD, L. J. *et al.* Serological studies of the feline

leukemia virus. **Bibliotheca Haematologica**, n. 36, p. 343-354, 1970.

HARDY, W. D., Jr; HESS, P. W.; MACEWEN, E. G. *et al.* Biology of feline leukemia virus in the natural environment. **Cancer Research**, v. 36, n. 2 pt 2, p. 582-588, 1976.

HARDY, W. D., Jr; HIRSHAUT, Y.; HESS, P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. **Bibliotheca Haematologica**, v. 39, p. 778-799, 1973.

HARDY, W.D. J. Haematopoietic tumors of cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 921-940, 1981.

HASCHEK, W. M.; WEIGEL, R. M.; SCHERBA, G. *et al.* Zidovudine toxicity to cats infected with feline leukemia virus. **Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 14, n. 4, p. 764-775, 1990.

HENDRICK, M. J.; GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S.; WANG, Y. Y.; SOMLYO, A. P. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. **Cancer Research**, v. 52, n. 19, p. 5391-5394, 1992.

HOFMANN-LEHMANN, R; HUDER, J. B.; GRUBER, S. *et al.* Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 7, p. 1589-1596, 2001.

HOFMANN-LEHMANN, REGINA; CATTORI, V.; TANDON, R. *et al.* Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5531-5539, 2007.

HOFMANN-LEHMANN, REGINA; TANDON, R.; BORETTI, F. S. *et al.* Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. **Vaccine**, v. 24, n. 8, p. 1087-1094, 2006.

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

HOOVER, E. A.; OLSEN, R. G.; HARDY, W. D., Jr; SCHALLER, J. P.; MATHES, L. E. Feline leukemia virus infection: age-related variation in response of cats to experimental infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 2, p. 365-369, 1976.

HOOVER, E. A.; SCHALLER, J. P.; MATHES, L. E.; OLSEN, R. G. Passive immunity to feline leukemia: evaluation of immunity from dams naturally infected and experimentally vaccinated. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 54-59, 1977.

HOSIE, M.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 125, p. 293-297, 1989.

HUTVÁGNER, G.; ZAMORE, P. D. RNAi: nature abhors a double-strand. **Current**

Opinion in Genetics & Development, v. 12, n. 2, p. 225-232, 2002a.

HUTVÁGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5589, p. 2056-2060, 2002b.

HWA KIM, S.; HOON JEONG, J.; CHUL CHO, K.; WAN KIM, S.; GWAN PARK, T. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine). **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 104, n. 1, p. 223-232, 2005.

JACQUE, J.-M.; TRIQUES, K.; STEVENSON, M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 435-438, 2002.

JARRETT, W. F.; CRAWFORD, E. M.; MARTIN, W. B.; DAVIE, F. A VIRUS-LIKE PARTICLE ASSOCIATED WITH LEUKEMIA (LYMPHOSARCOMA). **Nature**, v. 202, p. 567-569, 1964.

KANZAKI, L. I. B.; ORNELAS, S. S.; ARGAÑARAZ, E. R. RNA interference and HIV-1 infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 1, p. 5-18, 2008.

KASS, P. H.; BARNES, W. G., Jr; SPANGLER, W. L.; CHOMEL, B. B.; CULBERTSON, M. R. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 3, p. 396-405, 1993.

KHAIRUDDIN, N.; GANTIER, M. P.; BLAKE, S. J. *et al.* siRNA-induced immunostimulation through TLR7 promotes antitumoral activity against HPV-driven tumors in vivo. **Immunology and Cell Biology**, 2011.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 376-385, 2005.

KIM, V. N. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. **Genes & Development**, v. 20, n. 15, p. 1993-1997, 2006.

KIRPENSTEIJN, J. Feline injection site-associated sarcoma: Is it a reason to critically evaluate our vaccination policies? **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 59-65, 5 2006.

KNOWLES, J. O.; GASKELL, R. M.; GASKELL, C. J.; HARVEY, C. E.; LUTZ, H. Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 13, p. 336-338, 1989.

KOCIBA GJ. Hematologic consequences of feline leukaemia virus infection. **Current Veterinary Therapy**, v. XIII, n. In Kirk RW (Ed), 1986.

KOTA, J.; CHIVUKULA, R. R.; O'DONNELL, K. A. *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1005-1017, 2009.

LEE, M.-T. M.; COBURN, G. A.; MCCLURE, M. O.; CULLEN, B. R. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Primary Macrophages by

Using Tat- or CCR5-Specific Small Interfering RNAs Expressed from a Lentivirus Vector. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 11964-11972, 2003.

LEE, Y.; KIM, V. N. Preparation and analysis of Drosha. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 309, p. 17-28, 2005.

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

LI, B.; TANG, Q.; CHENG, D. *et al.* Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. **Nature Medicine**, v. 11, n. 9, p. 944-951, 2005.

LI, F.-Y.; CHENG, N.-S.; CHENG, J.-Q. *et al.* Treatment of chronic proliferative cholangitis with c-myc shRNA. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 15, n. 1, p. 95-101, 2009.

LI, L.; LIN, X.; KHVOROVA, A.; FESIK, S. W.; SHEN, Y. Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 10, p. 1765-1774, 2007.

LIU, Y. P.; VINK, M. A.; WESTERINK, J.-T. *et al.* Titers of lentiviral vectors encoding shRNAs and miRNAs are reduced by different mechanisms that require distinct repair strategies. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 7, p. 1328-1339, 2010.

LIU, Y. P.; WESTERINK, J.-T.; TER BRAKE, O.; BERKHOUT, B. RNAi-inducing lentiviral vectors for anti-HIV-1 gene therapy. **Methods in Molecular Biology**, v. 721, p. 293-311, 2011.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, NIELS C; LYONS, L. A. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 329-335, 2005.

LUBINI, P.; ZÜRCHER, W.; EGLI, M. Stabilizing effects of the RNA 2'-substituent: crystal structure of an oligodeoxynucleotide duplex containing 2'-O-methylated adenosines. **Chemistry & Biology**, v. 1, n. 1, p. 39-45, 1994.

LUTZ, H.; LEHMANN, R.; WINKLER, G. *et al.* [Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses]. **Schweizer Archiv Für Tierheilkunde**, v. 132, n. 5, p. 217-225, 1990.

LUTZ, H.; PEDERSEN, N.; HIGGINS, J. *et al.* Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p. 3642-3651, 1980.

MADEWELL, BRUCE R; GIEGER, T. L.; PESAVENTO, P. A.; KENT, M. S. Vaccine site-associated sarcoma and malignant lymphoma in cats: a report of six cases (1997-2002). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 1, p.

47-50, 2004.

MANCHE, L.; GREEN, S. R.; SCHMEDT, C.; MATHEWS, M. B. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 11, p. 5238-5248, 1992.

MANJUNATH, N.; WU, H.; SUBRAMANYA, S.; SHANKAR, P. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 9, p. 732-745, 25 2009.

MARQUEZ, R. T.; MCCAFFREY, A. P. Advances in microRNAs: implications for gene therapists. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 1, p. 27-38, 2008.

MCFARLAND, T. J.; ZHANG, Y.; APPUKUTTAN, B.; STOUT, J. T. Gene therapy for proliferative ocular diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, n. 7, p. 1053-1058, 2004.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C. F.; BRANCO, A. S. *et al.* Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.

MONIA, B. P.; LESNIK, E. A.; GONZALEZ, C. *et al.* Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 14514-14522, 1993.

MOORE, F. M.; EMERSON, W. E.; COTTER, S. M.; DELELLIS, R. A. Distinctive peripheral lymph node hyperplasia of young cats. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 4, p. 386-391, 1986.

MORRIS, K. V.; ROSSI, J. J. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. **Gene Therapy**, v. 13, n. 6, p. 553-558, 2006.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GAGE, F. H.; TRONO, D.; VERMA, I. M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11382-11388, 1996.

NELSON, P.; SELLON, R.; NOVOTNEY, C. *et al.* Therapeutic effects of diethylcarbamazine and 3'-azido-3'-deoxythymidine on feline leukemia virus lymphoma formation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1-2, p. 181-194, 1995.

OGILVIE, G. K.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosuppression. **Veterinary Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 287-296, 1988.

OROSZ, C. G.; ZINN, N. E.; OLSEN, R. G.; MATHES, L. E. Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. **Journal of Immunology**, v. 134, n. 5, p. 3396-3403, 1985a.

OROSZ, C. G.; ZINN, N. E.; OLSEN, R. G.; MATHES, L. E. Retrovirus-mediated immunosuppression. II. FeLV-UV alters in vitro murine T lymphocyte behavior by reversibly impairing lymphokine secretion. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 1, p. 583-590, 1985b.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O.; HAY, D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 14, p. 381-384, 1986.

PERRYMAN, L. E.; HOOVER, E. A.; YOHAN, D. S. Immunologic reactivity of the cat: immunosuppression in experimental feline leukemia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, n. 5, p. 1357-1365, 1972.

PU, C.; WANG, L.; MIAO, X. *et al.* Optimized tandem amiRNA mediates stronger inhibitory effects on hepatitis B virus infection. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD**, v. 20, n. 3, p. 271-278, 2011.

QUIGLEY, J. G.; BURNS, C. C.; ANDERSON, M. M. *et al.* Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 1093-1099, 2000.

REINACHER, M. Feline leukemia virus-associated enteritis--a condition with features of feline panleukopenia. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 1, p. 1-4, 1987.

REINACHER, M. Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 21, n. 1, p. 85-95, 1989.

REINACHER, M.; THEILEN, G. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 6, p. 939-945, 1987.

REYNOLDS, A.; LEAKE, D.; BOESE, Q. *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 326-330, 2004.

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

ROGERSON, P.; JARRETT, W.; MACKAY, L. Epidemiological studies on feline leukaemia virus infection. I. A serological survey in urban cats. **International Journal of Cancer**, v. 15, p. 781-785, 1975.

ROY-BURMAN, P. Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses. **Virus Genes**, v. 11, n. 2-3, p. 147-161, 1995.

RUSSELL, P. H.; JARRETT, O. The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 21, n. 6, p. 768-778, 1978.

SARMA, P. S.; TSENG, J.; LEE, Y. K.; GILDEN, R. V. Virus similar to RD114 virus in cat cells. **Nature: New Biology**, v. 244, n. 132, p. 56-59, 1973.

SATO, Y.; MURASE, K.; KATO, J. *et al.* Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 431-442, 2008.

SCHOPMAN, N. C. T.; BRAKE, O. TER; BERKHOUT, B. Anticipating and blocking HIV-1 escape by second generation antiviral shRNAs. **Retrovirology**, v. 7, p. 52, 2010.

SCOTT DW, B. C.; SCHULTZ RD; POST JE; BOLTON GR. Autoimmune haemolytic anemia in the cat. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 9(6), p. 530-547, 1973.

SILVA, J. M.; LI, M. Z.; CHANG, KEN; *et al.* Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p. 1281-1288, 2005.

SINGER, O.; VERMA, INDER M. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. **Current Gene Therapy**, v. 8, n. 6, p. 483-488, 2008.

SOE, L. H.; DEVI, B. G.; MULLINS, J. I.; ROY-BURMAN, P. Molecular cloning and characterization of endogenous feline leukemia virus sequences from a cat genomic library. **Journal of Virology**, v. 46, n. 3, p. 829-840, 1983.

SONG, E.; LEE, S.K.; DYKXHOORN, D.M.; *ET AL.* Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. **J. Virol.** 77, 7174–7181, 2003.

SPARKES, A. Feline leukaemia virus and vaccination. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 5, p. 97-100, 2003.

SPARKES, A. H. Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 5, p. 187-194, 1997.

STARK, G. R.; KERR, I. M.; WILLIAMS, B. R.; SILVERMAN, R. H.; SCHREIBER, R. D. How cells respond to interferons. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 227-264, 1998.

STRICAGNOLO C.; JUNQUEIRA J. Infecção pelo vírus da leucemia felina em gatos de diversas cidades do Brasil. **Revista Clínica Veterinária**, v. 66, p. 44-50, 2007.

SUBRAMANYA, S.; KIM, S.-S.; MANJUNATH, N.; SHANKAR, P. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: synthetic siRNA or vector-based shRNA? **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 2, p. 201-213, 2010.

SUMIMOTO, H.; KAWAKAMI, Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research. **Future Oncology (London, England)**, v. 3, n. 6, p. 655-664, 2007.

TAKESHITA, F.; MINAKUCHI, Y.; NAGAHARA, S. *et al.* Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 34, p. 12177-12182, 2005.

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

TANDON, R.; CATTORI, V.; WILLI, B. *et al.* Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, n. 4, p. 257-266, 2007.

TAVARES, L.; RONEKER, C.; JOHNSTON, K.; LEHRMAN, S. N.; NORONHA, F. DE. 3'-Azido-3'-deoxythymidine in feline leukemia virus-infected cats: a model for therapy and prophylaxis of AIDS. **Cancer Research**, v. 47, n. 12, p. 3190-3194, 1987.

TEMIN, H. M.; MIZUTANI, S. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. **Nature**, v. 226, p. 1211-1213, 1970.

TENORIO, A. P.; FRANTI, C. E.; MADEWELL, B R; PEDERSEN, N C. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 29, n. 1-2, p. 1-14, 1991.

The Merck Veterinary Manual. 9th ed. ed. [S.l.]: Kahn C, 2005.

TISCORNIA, G.; SINGER, O.; IKAWA, M.; VERMA, INDER M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1844-1848, 2003.

VAIL D.M.; THAMM D. Hematopoietic tumors. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Missouri: Ettinger S.J., Feldman E.C., p. 732-747, 2005.

VAUCHERET, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. **Genes & Development**, v. 20, n. 7, p. 759-771, 2006.

WÄLDELE, K.; SILBERMANN, K.; SCHNEIDER, G. *et al.* Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4491-4499, 2006.

WEIJER, K.; UYTDEHAAG, F. G.; JARRETT, O; LUTZ, H.; OSTERHAUS, A. D. Post-exposure treatment with monoclonal antibodies in a retrovirus system: failure to protect cats against feline leukemia virus infection with virus neutralizing monoclonal antibodies. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 38, n. 1, p. 81-87, 1986.

WESTERHOUT, E. M. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 796-804, 2005.

WILLIAM D. HARDY JR. Feline oncoretroviruses. **The Retroviridae**. v. 2p. 109–180, 1993.

WIZNEROWICZ, M.; TRONO, DIDIER. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8957-8961, 2003.

XIA, H.; MAO, Q.; PAULSON, H. L.; DAVIDSON, B. L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1006-1010, 2002.

YACOUB, N. AL; ROMANOWSKA, M.; HARITONOVA, N.; FOERSTER, J. Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, n. 7, p. 579-584, 2007.

ZENG, Y.; WAGNER, E. J.; CULLEN, BRYAN R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. **Molecular Cell**, v. 9, n. 6, p. 1327-1333, 2002.

ZHOU, J.; LI, H.; ZHANG, J.; PIOTR, S.; ROSSI, J. Development of cell-type specific anti-HIV gp120 aptamers for siRNA delivery. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 52, 2011.

ZHOU, J.; ROSSI, JOHN J. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 721, p. 67-75, 2011.

APÊNDICE: MANUSCRITO

Inhibition of Feline Leukemia Virus replication in chronically infected cell line utilizing RNA Interference.

Number of words: 4016

Authors:

M.Sc. Sócrates S. Ornelas¹,

Ph.D Gustavo B. Barra²

D.Sc. Luis I. B. Kanzaki^{1§}

Authors Affiliations:

¹Laboratory of Bioprospection, University of Brasília, DF, Brazil. CEP 70910-900.

²Sabin Institute and Laboratory, SHIN CA 05 Bloco H Ap 325, Lago Norte Brasília, DF, Brazil. CEP: 71503-505.

Corresponding Author:

L. I. B. Kanzaki, Laboratory of Bioprospection, University of Brasília, DF, Brazil. CEP: 70910-900. Tel.:+55-61-81387917. Email: kanzaki@unb.br

Authors' contributions

SSO performed the experiments and prepared the manuscript; GB contributed with the RT assay; LIBK supervised the work. The final manuscript was read and accepted by all authors.

Manuscript submitted to: **Retrovirology: Research and Treatment**

Why this manuscript is appropriate for this journal?

FeLV occurs worldwide. Its prevalence may be influenced by the density of cats and there may be noticeable geographical and local variation. So far, no efficient treatment for viremic animals is available. Hence, the use of FeLV model to evaluate antiretroviral therapy applied to other retroviruses is a timely task. Besides, the use of RNA interference (RNAi) as a therapeutic tool for a variety of viral infections and diseases in humans and animals is valid and needs to be rigorously evaluated by different research groups. In this work, the RNAi technology utilizing plasmid and lentiviral vectors delivered into feline cells expressing FeLV reduced viral replication. Vaccine does not provide 100% protection efficacy. Therefore, other preventive and curative measures for FeLV infected felids should be investigated. Gene therapy is a promising strategy utilizing RNA interference as a model exercising to control FeLV infection.

The results reported here support the assumption that RNAi technology could be useful as a gene therapy strategy in a model for the control of FeLV infection in the future. Concluding, FeLV is an oncogenic retrovirus, and experimental, therapeutic procedures, which could restrict, or even eliminate virus infection, clearing the proviral form entirely from the host cell genome, is a subject believed to fit adequately to the scope of the journal *Retrovirology: Research and Treatment*.

Abstract

Feline Leukemia virus (FeLV) is a pathogenic retrovirus endemic among domestic cats remaining a serious disease since its discovery in 1964. RNA interference (RNAi) is a procedure in which double-stranded RNA signalizes the post-transcriptional sequence-specific cleavage of homologous messenger RNA. As a potential strategy for the treatment of various diseases, RNAi technology nowadays could be used to inhibit the expression of desired peptides/proteins. The present study aimed to apply the RNAi technology to curb FeLV replication. The effect of vector-mediated transfer and expression of FeLV specific short hairpin RNA (shRNA) against messenger RNA for p27 peptide expression, and replication of FeLV in a feline T-cell line chronically infected with FeLV (3201-EECC) is the focus here. Three shRNA homologous to the FeLV *gag* gene synthesized, cloned and transfected into a feline fibroblastic cell line (CrFK) expressing FeLV, efficiently reduced FeLV p27 protein expression, consequently decreasing and inhibiting viral replication in a chronically FeLV infected feline T-cell line (3201-EECC). The expression of shRNA against FeLV *gag* gene showed to markedly lower p27 levels and viral replication in both cell lines, 3201-EECC and CrFK. These results provided valuable information concerning the development of gene therapy strategy to control FeLV and related pathogenic retroviruses infection in the future.

Keywords: RNA interference; FeLV; *gag*; p27; cat.

Introduction

The Feline Leukemia Virus (FeLV) is a member of the *Retroviridae* family, sharing with the Xenotropic Murine Leukemia Virus-related gammaretrovirus (MLV) and the Gibbon Ape Leukemia Retrovirus (GALV) the genus *gammaretrovirus*. FeLV is pathogenic for domestic cats and involved in proliferative, degenerative, and immunosuppressive disorders likewise immunodeficiency, anemia and lymphoma (1–5). Since its discovery in 1964, FeLV remains a serious pathogen of domestic cats. Most of FeLV infections occurs after oronasal spread of the virus in saliva of viremic cats (6,7). The worldwide prevalence of FeLV infection is not well known, anyway it is remarkably low among individually captive cat, approximately 1%, and higher than 20% in large multicat households without practicing preventive measures for the introduction of FeLV (8).

FeLV is a simple retrovirus just carrying the necessary genes for replication, lacking cancer-causing oncogenes; nonetheless, the virus is responsible for a large proportion of lymphoid and myeloid malignancies in pet cats (1, 2, 6, 9, 8, 10–13). The virus contains a diploid RNA genome. Each strand contains the three genes (*gag*, *pol*, and *env*) required for viral replication. The *gag* gene encodes the structural proteins of the virion core (p10, p15 and p27); the *pol* gene encodes an RNA-dependent DNA polymerase; and the *env* gene encodes the envelope glycoproteins of the virion surface (3, 14).

Studies hypothesize that cancer development promoted by the virus occurs in two main ways. Firstly, it acts through the insertional mutagenesis, activating cellular oncogenes driven by proviral sequences involved in virus replication (15). Secondly, it refers to a process termed transduction, by which FeLV provirus acquires cellular

oncogenes, such as *myc*, by recombination (12, 16); such recombinant viruses can lead to rapid neoplasm development (10).

In the treatment of FeLV infected cats, it is necessary a timely and accurate identification of diseases affecting them, in order to provide an early therapeutic intervention for a successful outcome. Chemotherapeutic drugs, immune modulators, antivirals and vaccination should be combined to treat FeLV infected cats (8, 17, 18). Therapeutic procedures employing feline omega interferon (ω interferon) aiming to curb FeLV viremia, showed to improve the clinical condition significantly and extend the survival time of infected cats, although it did not reverse viremia (10, 19). An antiviral compound routinely used, 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT), demonstrated to reduce the plasma viral load, improving the immunological and clinical status, increasing the quality of life and prolonging life expectancy in some FeLV-infected cats (20). However, the manifestation of severe hematological side effects by the use of antiviral drugs and poor clinical improvements in FeLV-infected cats has also been reported (1, 10). Cat vaccination is an essential preventive measure, anyway most FeLV vaccines limit antigenaemia but does not abort viral genome integration in the host cell DNA (17). Therefore, any effective antiviral procedure for FeLV-infected cats is not yet established (16).

RNA interference (RNAi) operates by a sequence specific, post-transcriptional gene silencing (PTGS) ignited by double-stranded RNA (dsRNA) homologous to the target transcripts (21). The reaction initiated by the introduction of a double-stranded RNA (dsRNA) into the cell cytoplasm, results in the destruction of targeted mRNA and a subsequent reduction in protein production (22). When successfully manipulated, the

RNAi mechanism knockdowns single or multiple genes, providing a quick and convenient method of analyzing gene function (23–29). Recent studies have demonstrated that RNAi can be exploited, in order to target genetic sequences, of a variety of human and animal viruses. Messenger RNA of HIV-1, Poliovirus, Human Papillomavirus (HPV), Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis B Virus (HBV), Influenza Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) and Feline Immunodeficiency Virus (FIV) were targets of RNAi catalysis (9, 30–39). These studies confirmed that, RNAi technology represents a promising gene therapeutic approach to control viral infection and disease progression. Previous studies applying RNAi directed to structural genes inhibited viral replication of HIV and FIV (30–33, 40).

The expression of shRNAs against FeLV *gag* gene by the pSUPER vector system in FeLV replicated in fibroblastic cells, and a retrovirus vector expressing a FeLV-specific shRNA, in a chronically FeLV-infected feline T lymphoid cell line centered the proposal in this study, aiming to assess the efficient delivery and expression of FeLV-specific shRNA, and the steady inhibitory effect of FeLV in these cells.

Material and Methods

Cells

The NIH AIDS reagents and Dr. D. Looney kindly donated a feline fibroblastic cell line (CrFK) and the Human 293T cells, respectively. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO), RPMI 1640 (45%) and Leibovitz's L-15 (45%) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and

penicillin/streptomycin (GIBCO) maintained the cell lines including the feline T-cell line, 3201, chronically infected with FeLV-EECC (3201-EECC), NIH strain.

Plasmid construction

The general guidelines (22) oriented the designing and synthesis (Invitrogen) of target sequences, therefore, three selected sequences (F1, F2 and F3); corresponding to the *gag* gene of FeLV Rickard strain, subgroup A (GenBank accession number: AF052723), based on the conserved sequence of FeLV *gag* gene. Table 1 shows sequences of sense and antisense strands directed to FeLV *gag* gene. The oligonucleotides strands annealed and cloned into the pSUPER vector essentially as previously described (39) to generate pH1-F1, pH1-F2 and pH1-F3 constructs. The control (pH1-GFP) consisted of a target sequence described before (9, 38) against the Green Fluorescent Protein (GFP) (22, 39, 41).

Digestion with *Cla*I and *Xba*I removed DNA sequences containing the H1 promoter and encoding shRNA from the pSUPER vector, and subcloned these fragments into the same sites, in the pNL-SINCMV-BLR vector (40, 42, 43) (kindly provided by Dr. Bryan R. Cullen) to generate the pNL-H1-F1 and pNL-H1-GFP constructs as previously described (40). The negative control consisted of a similar lentivirus vector containing the H1 promoter, lacking any shRNA precursor, termed pNL-H1.

CrFK cells transfection.

CrFK cells were co-transfected with 0.5 μ g of pEECC-FeLV (NIH AIDS reagents) and 3.5 μ g of pH1-F1, pH1-F2, pH1-F3 or pH1-GFP, respectively, by the calcium phosphate method, (44) plated at 2×10^5 cells per well (9.6 cm²) with DMEM

in six-well plates for 24 h, to produce the shRNA. The culture medium replacement and supernatant media harvest occurred 16 h later and ~48 h post transfection respectively. Analysis of shRNA efficiency, after cell pellet lysis, went through the immunoblotting detection of p27 protein expression or RT assay.

Immunoblotting analysis

CrFK cells were harvested ~48 h posttransfection and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-Cl [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100). Obtained protein was electrophoresed on 10% SDS/polyacrylamide gel and electroblotted onto PVDF membranes (Hybond P, GE Healthcare, Wien). Protein immunodetection was performed using NBT/BCIP Stock Solution (ROCHE) according to the manufacturer's instructions. Briefly, blotted membrane was blocked overnight with 5% nonfat dry milk in TBS-T (20 mM Tris-Cl [pH 7.6], 280 mM NaCl, 0.1% Tween-20). Exposed membrane to goat anti-FeLV p27 (diluted 1:2000; NCI Repository) or anti-GAPDH (diluted 1:500 in TBS-T containing 5% nonfat dry milk; FL-335; Santa Cruz Biotechnology) was incubated for 1 h at room temperature. After membrane washing, it was re incubated for 1 h at room temperature, with a secondary anti-goat or anti-mouse antibody conjugated with Alkaline Phosphatase (diluted in TBS-T 1:1000; abcam). Densitometric analysis was performed using ImageJ software (NIH).

Preparation of virus stocks and transduced cells.

The HIV-1-based lentivirus vectors expressing shRNAs were prepared by co-transfection of 293T cells with 1.8 µg of the lentivirus vector, 0.1 µg of pcRev, 0.1 µg of pcTat, and 50 ng of pHIT/G as previously described (40). The culture medium was

replaced 16 h later; the supernatant media was harvested ~48 h posttransfection and passed through a 0.45 μm -pore-size filter. Retroviral RNA was quantified by the Reverse Transcriptase Assay.

A feline T-cell line, 3201-EECC, chronically infected with FeLV, was seeded into a 12-well plate at 2×10^5 cells/well. Lentivirus vectors, at a multiplicity of infection (MOI) of 10, in a final volume of 1 ml of medium (45% RPMI 1640/45% of Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% heat inactivated FBS and penicillin/streptomycin), were inoculated in each cell well. After incubation at 37°C for 48 h, the cells were washed twice with PBS, and then cultured in the presence of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of blasticidin S hydrochloride (Sigma) for 15 days to generate stably transduced cells.

Reverse transcriptase (RT) activity assay

FeLV particles were precipitated and concentrated with polyethylene glycol (PEG 6000). Initially, 3201 EECC cells were centrifuged at $250 \times g$ for 10 min to remove cell debris. Obtained supernatant was centrifuged at $2000 \times g$ for 30 min. Sequentially, 1 ml of PEG solution was added to 2 mL of cleared supernatant and incubated overnight at 4°C. The pellet containing virions was obtained by centrifugation at $800 \times g$ for 45 min., and stored at -60°C. All centrifugation procedures were carried out at 4°C. Virions were lysed using 10% Triton X-100 (1% final concentration) in RPMI medium supplemented with 10% FBS, and RT units were measured in triplicate, using EnzChek Reverse Transcriptase Assay Kit (Invitrogen).

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) used to test for a significant difference in each RT quantification, and the

Student's t-test was performed to determine which pair showed the difference. Statistical significance was evaluated at $p < 0.05$.

Results

Inhibition of p27 expression in CrFK transfected cells.

Immunoblotting analysis of cells' extracts, after ~48 h postransfection demonstrated the reduction of FeLV p27 protein expression in transfected cells with pH1-F1 and pH1-F2 vectors compared to mock-transfected (pH1-GFP) cells (Fig. 1A). Among the three anti-FeLV shRNAs vector expression, pH1-F2 showed the strongest inhibitory effect on FeLV p27 protein expression in CrFK cells. The densitometric analysis confirmed p27 reduction after co-transfection of vectors expressing shRNA against *gag* with FeLV plasmid expression, exhibiting the F2 sequence a marked reduction of protein expression, as shown as $1.8 \pm 0,38$ units for pH1-F2 with pEECC vs. $8.46 \pm 1,12$ units for pH1-GFP with pEECC expression ($p < 0.05$) (Fig. 1B).

Effect of shRNAs expression on FeLV replication in CrFK transfected cells.

The inhibitory effect of anti-FeLV shRNA on FeLV replication in CrFK cells was evaluated by measuring RT activity in the supernatant of co-transfected cells with pEECC and pH1-GFP (Mock) or pH1-F1 or pH1-F2. Co-transfected cells with pH1-F2 showed significantly lower RT units than those of untreated cells, $0.25 \pm 0,05$ vs. $0.84 \pm 0,12$ RT units respectively and $0.41 \pm 0,07$ RT units reduction in pH1-F1 co-transfected cells ($p < 0.05$) (Fig. 2). These results indicated that shRNA against FeLV *gag* gene could specifically inhibit Feline Leukemia virions release from transfected cells.

Effect of FeLV-specific shRNA on FeLV replication in 3201-EECC cells

FeLV-infected T cells (3201-EECC cells) inoculated with VSV-G pseudotyped lentivirus vector, stably expressing shRNA, were selected utilizing blasticidin. FeLV replication in these cells was monitored during 15 days after inoculation with the lentivirus vectors.

The RT activity measured in the supernatant of transduced cells with the lentivirus vector carrying shRNA specific to FeLV (shF2) was significantly lower (0.86 ± 0.11 Units) than in the untreated cells (3.04 ± 0.16 Units) ($p < 0.05$), and in the infected cells with the lentivirus vector control with only the H1 promoter (shH1) (2.41 ± 0.28 Units) (Fig. 3).

Discussion

Since the RNAi technology has been developed, a plethora of genes from eucaryotes, prokaryotes and viruses have been studied, and as a therapeutic tool, a variety of viral diseases in humans and animals have been treated. The inhibition of HIV-1 and FIV (29–33, 40, 45, 46) replication among other viruses could be accomplished by the shRNA expression in established and primary cell lines. Here, it was investigated the feasibility of using RNAi technology, based in shRNA expression, aiming at controlling FeLV infection in feline cell lines. The present study was carried out to demonstrate the potentiality of RNAi technology approach as a strategy for the control of FeLV infection, as also to demonstrate that it is possible to reduce FeLV replication *in vitro* by RNAi technology. A lentiviral vector expressing shRNA, specifically targeting FeLV gene sequences, was developed and its effect examined upon the transference into feline cell lines.

In order to identify the target sequence which can efficiently inhibit FeLV replication, it was checked out the effects of homologous sequences to FeLV *gag* gene on FeLV co-transfected CrFK cells. Three homologous target sequences to *gag* gene were used to construct three clones against EECC-FeLV clone (pH1-F1, pH1-F2 and pH1-F3) and co-transfected with pEECC plasmid on CrFK transfected cells. We demonstrated that transfection with vectors expressing anti-FeLV shRNAs (F1 and F2) resulted in reduction of p27 protein expression (Fig. 1) and RT activity in the supernatant culture (Fig. 2), indicating that a region of FeLV *gag* gene can be targeted by shRNA, as other types of retrovirus like HIV and FIV, for example (30–33, 40). The F3 vector expressing anti-FeLV shRNA failed to reduce p27 protein expression, despite its complementarity to the *gag* sequence. Distinct factors could influence the inhibition of mechanisms exerted by the anti-FeLV shRNA, including technical errors.

Lentiviral vectors can infect both, dividing and nondividing cells, changing the expression of their target cell genes, being capable to provide highly effective gene therapy devices (47). Therefore, we examined the effect of the lentivirus vector mediated transfer and expression of the shRNA in feline T-cell line. The amount of RT activity in the culture supernatant of the 3201 EECC cell line was markedly decreased even 15 days after transduction with a lentiviral vector expressing shRNA specific to FeLV (pNL H1-F2) (Fig. 3). This reduction in RT activity observed in chronically FeLV-infected cell line, 3201, supports a future use of this tool in FeLV gene therapy. However, the interference RNA virus escape was observed in other virus systems (48,49), but in the FeLV system, the results could be distinct as significant changes in FeLV render the virus less viable than FIV and HIV (3). In this case, the shRNA could be a new treatment strategy in the future for FeLV infected cats.

Further investigation is necessary to improve the transduction efficiency of the lentivirus vector in cats' primary T cells. Also, hematopoietic stem cells are promising target candidates for RNAi gene therapy in order to control FeLV infection. The development of antiviral gene therapy strategies targeting these cells has been proposed as a long-term treatment for AIDS. Nevertheless, the feline hematopoietic stem cells' isolation and purification system has not been established. Probably, the viral vector-mediated transfer of anti-FeLV shRNA and other genes into these cells, will be a useful gene therapy strategy, for the control of FeLV infection, and treatment of infected cats in the future.

The goal of the gene therapy strategy for the control of FeLV infection is to achieve FeLV-resistant hematopoietic cells and/or to prevent disease progression. It is highly plausible that the F2 target sequence inhibits the replication of various FeLV field strains as well as the EECC strain, and probably can be used to protect the cells, in

any case. Gene silencing by RNAi mechanism requires nearly perfect complementarity between the shRNA and target sequence, besides clinical trials would result differently from *in vitro* studies. The efficacy of shRNA generated in this research study needs to be investigated in other FeLV strains. In any case, this work demonstrates the reduction of FeLV infection by the RNAi technology and open an opportunity to continue experiments aiming to develop alternative gene therapy models.

Conclusions

In summary, the expression of shRNAs homologous to FeLV *gag* gene efficiently inhibited p27 production and FeLV replication in CrFK cell line. In addition, lentivirus vector-mediated transfer and expression of FeLV-specific shRNA could halt virus replication in chronically infected FeLV lymphoid cells. The present study indicated that the RNAi technology could be useful as a gene therapy strategy for the control of FeLV infection.

Disclosures

All authors read and approved this manuscript. This paper is unique and not under consideration by any other publication and has not been published elsewhere. The authors and peer reviewers report no conflicts of interest. The authors confirm that they have permission to reproduce any copyrighted material.

Acknowledgements

SSO was supported by a scholarship from CAPES, Brazil. This research was in part financially supported by the University of Brasilia and Banco da Amazonia, Brazil. We also thank the Sabin Laboratory for the technical and material support.

References

1. Shelton G.H., Linenberger M.L. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 1995. 10(4):220–33.
2. Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011. 143(3-4):190–201.
3. Dunham SP, Graham E. Retroviral infections of small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2008. 38(4):879–901.
4. Hartmann K, Kraft W. Retrovirus infections of the cat: feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). A review from the clinical viewpoint. *Tierarztl Prax.* 1993. 21(6):541–57.
5. Fischer N, Schulz C, Stieler K, Hohn O, Lange C, Drosten C, Aepfelbacher M. Xenotropic Murine Leukemia Virus–related Gammaretrovirus in Respiratory Tract. *Emerg. Infect. Dis.* 2010. 16(6):1000-2.
6. Jarret WF, Martin WB, Crighton GW, Dalton RG, Stewart MF. Transmission experiments with Leukemia (LYMPHOSARCOMA). *Nature.* 1964. 202:566–7.
7. Jarret WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A virus-like particle associated with Leukemia (LYMPHOSARCOMA). *Nature.* 1964. 202:567–9.
8. Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009. 11(7):565–74.
9. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. 100(4):1844–8.
10. Hardy, W.D. J. Haematopoietic tumors of cats. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 1981. 17:921–940.
11. McCaw DL, Boon GD, Jergens AE, Kern MR, Bowles MH, Johnson JC. Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001. 37(4):356–63.
12. Levy LS, Gardner MB, Casey JW. Isolation of a feline leukaemia provirus containing the oncogene myc from a feline lymphosarcoma. *Nature.* 1984. 308(5962):853–6.
13. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer

- morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.* 1968. 40(2):307–18.
14. Laprevotte I, Hampe A, Sherr CJ, Galibert F. Nucleotide sequence of the gag gene and gag-pol junction of feline leukemia virus. *J. Virol.* 1984. 50(3):884–94.
 15. Lenz J, Celander D, Crowther RL, Patarca R, Perkins DW, Haseltine WA. Determination of the leukaemogenicity of a murine retrovirus by sequences within the long terminal repeat. *Nature.* 1984. 308(5958):467–70.
 16. Cattori V, Weibel B, Lutz H. Inhibition of Feline leukemia virus replication by the integrase inhibitor Raltegravir. *Vet. Microbiol.* 2011. 152(1-2):165–8.
 17. Hofmann-Lehmann R, Cattori V, Tandon R, Boretti FS, Meli ML, Riond B, et al. Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine.* 2007. 25(30):5531–9.
 18. de Mari K, Maynard L, Sanquer A, Lebreux B, Eun H-M. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2004. 18(4):477–82.
 19. Greggs WM 3rd, Clouser CL, Patterson SE, Mansky LM. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2011. 7:115–22.
 20. Hartmann K. FeLV treatment strategies and prognosis. *Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 2005. 27:14–26.
 21. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998. 391(6669):806–11.
 22. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001. 411(6836):494–8.
 23. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. 4(6):457–67.
 24. Check E. Pioneering HIV treatment would use interference and gene therapy. *Nature.* 2005. 437(7059):601.
 25. Li J, Dai Y, Liu S, Guo H, Wang T, Ouyang H, et al. In vitro inhibition of CSFV replication by multiple siRNA expression. *Antiviral Res.* 2011. 91(2):209–16.

26. McJunkin K, Mazurek A, Premssirut PK, Zuber J, Dow LE, Simon J, et al. Reversible suppression of an essential gene in adult mice using transgenic RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. 108(17):7113–8.
27. Yeung ML, Bennasser Y, LE SY, Jeang KT. siRNA, miRNA and HIV: promises and challenges. *Cell Res.* 2005. 15(11-12):935–46.
28. Bagasra O. RNAi as an antiviral therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2005. 5(11):1463–74.
29. Liu YP, Westerink J-T, Ter Brake O, Berkhout B. RNAi-inducing lentiviral vectors for anti-HIV-1 gene therapy. *Methods Mol. Biol.* 2011. 721:293–311.
30. Kanzaki LIB, Ornelas SS, Argañaraz ER. RNA interference and HIV-1 infection. *Rev. Med. Virol.* 2008. 18(1):5–18.
31. Jacque J-M, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature.* 2002. 418(6896):435–8.
32. Baba K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, et al. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* 2008. 70(8):777–83.
33. Baba K, Mizukoshi F, Goto-Koshino Y, Setoguchi-Mukai A, Fujino Y, Ohno K, et al. Application of RNA interference for inhibiting the replication of feline immunodeficiency virus in chronically infected cell lines. *Vet. Microbiol.* 2007. 120(3-4):207–16.
34. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene.* 2002. 21(39):6041–8.
35. Randall G. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002. 100(1):235–40.
36. Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology.* 2003. 37(4):764–70.
37. Wang Z, Ren L, Zhao X, Hung T, Meng A, Wang J, et al. Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Replication by Small Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Journal of Virology.* 2004. 78(14):7523–7.

38. Hwa Kim S, Hoon Jeong J, Chul Cho K, Wan Kim S, Gwan Park T. Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine). *J Control Release*. 2005. 104(1):223–32.
39. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002. 296(5567):550–3.
40. Lee M-TM, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Primary Macrophages by Using Tat- or CCR5-Specific Small Interfering RNAs Expressed from a Lentivirus Vector. *Journal of Virology*. 2003. 77(22):11964–72.
41. Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol*. 2003. 77(16):8957–61.
42. Wäldele K, Silbermann K, Schneider G, Ruckes T, Cullen BR, Grassmann R. Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood*. 2006. 107(11):4491–9.
43. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi J-TA, et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*. 2007. 450(7172):1096–9.
44. Graham F. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973. 52(2):456–67.
45. Zhou J, Li H, Zhang J, Piotr S, Rossi J. Development of cell-type specific anti-HIV gp120 aptamers for siRNA delivery. *J. Vis. Exp*. 2011. 52.
46. Zhou J, Rossi JJ. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics. *Methods Mol. Biol*. 2011. 721:67–75.
47. Giry-Laterrière M, Verhoeyen E, Salmon P. Lentiviral vectors. *Methods Mol. Biol*. 2011. 737:183–209.
48. Schopman NCT, ter Brake O, Berkhout B. Anticipating and blocking HIV-1 escape by second generation antiviral shRNAs. *Retrovirology*. 2010. 7:52.
49. Westerhout EM. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Research*. 2005. 33(2):796–804.

Tables**Table 1.** Target sequences and corresponding regions in genome of FeLV-A clone.

Identification	Target sequence	FeLV-A genome position (nt)
F1 - Sense	5' – GGTAAGCAGGTTGTACAAGG – 3'	1911 - 1931
F2 - Sense	5' – GCAGCTAGTGTTATACTATCC – 3'	2020 - 2040
F3 - Sense	5' – GCAAGCAGCTAGTGTTATACT – 3'	2016 - 2036

Figure legends

Figure 1. A) Effect of shRNAs on the expression of p27 protein in CRFK/FeLV cells. Regulation of p27 protein expression in CRFK cells transfected with pEECC plasmid and shRNA expression vector against *gag* gene. The shRNA expression vector against GFP was used as a control. The immunoblotting assay was performed with polyclonal antibody against p27 and monoclonal antibody against GAPDH (as a control). The first line corresponded to the GAPDH levels in the cells and the second line corresponded to p27 levels in the cells. The p27 levels reduced in the presence of the pH1-F1 and pH1-F2 vectors. **B)** Densitometric analysis of p27 expression. The p27 protein content was determined by the Immunoblotting analysis, and the data are expressed as integrated density in arbitrary units $\times 10^4$. The columns and bars show means and standard deviations, respectively, obtained from the data in triplicate samples.

Figure 2. Effect of shRNA expression on the releasing of FeLV in CRFK cells. The RT activity in the culture supernatants was measured ~48 h after co-transfection with shRNA vector expression and pEECC vector. The columns and bars show means and standard deviations, respectively, obtained from the data in triplicate samples. A target sequence GFP was used as a control (pH1-GFP).

Figure 3. Effect of lentivirus vector-mediated transfer and expression of FeLV-specific shRNA on the replication of FeLV in 3201 EECC cells. The cells were transduced with the lentivirus vector, which express shRNA (F2 target sequence) or only H1 promoter, and then selected under blasticidin treatment. The RT activity in the culture supernatants was measured 15 days after lentivirus vector-mediated transfection. The columns and bars show means and standard deviations, respectively, obtained from the data in triplicate samples.

Figures

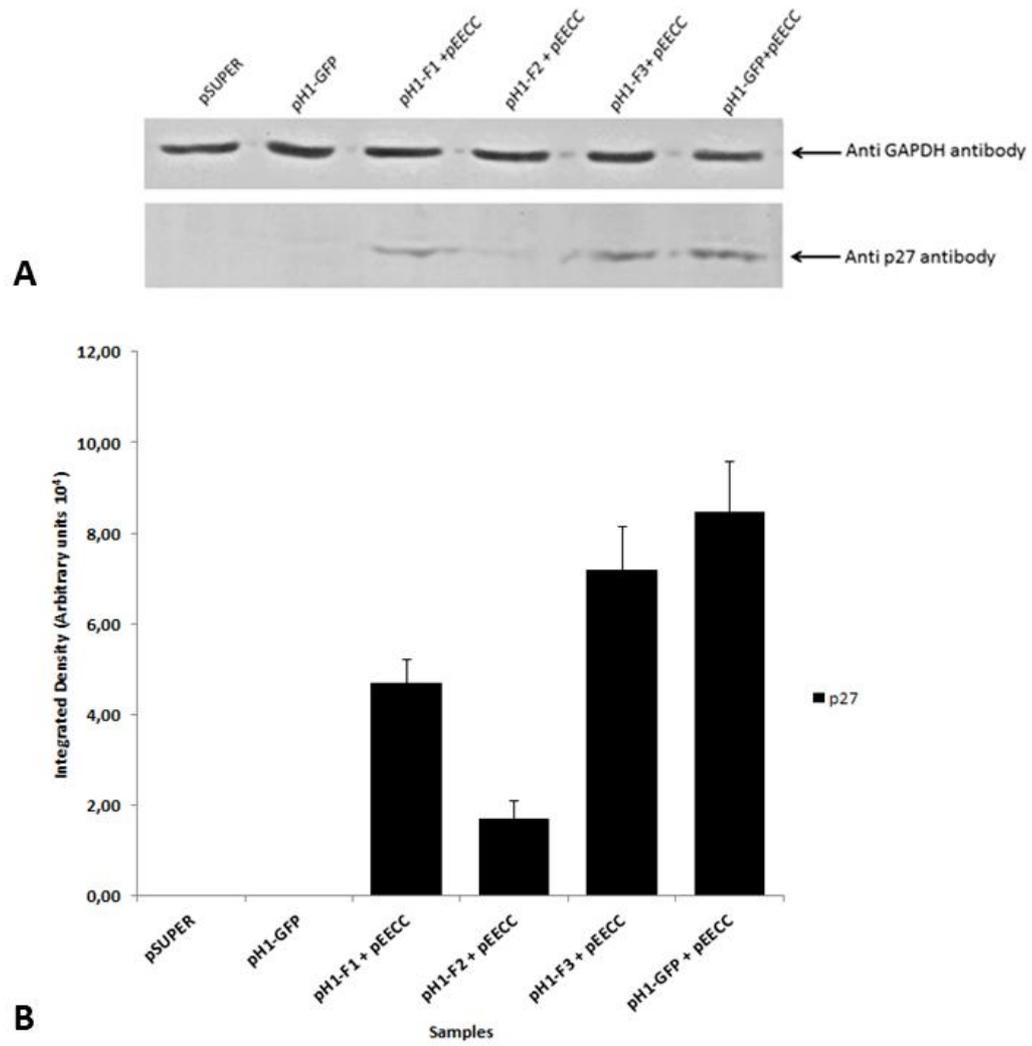


Figure 1.

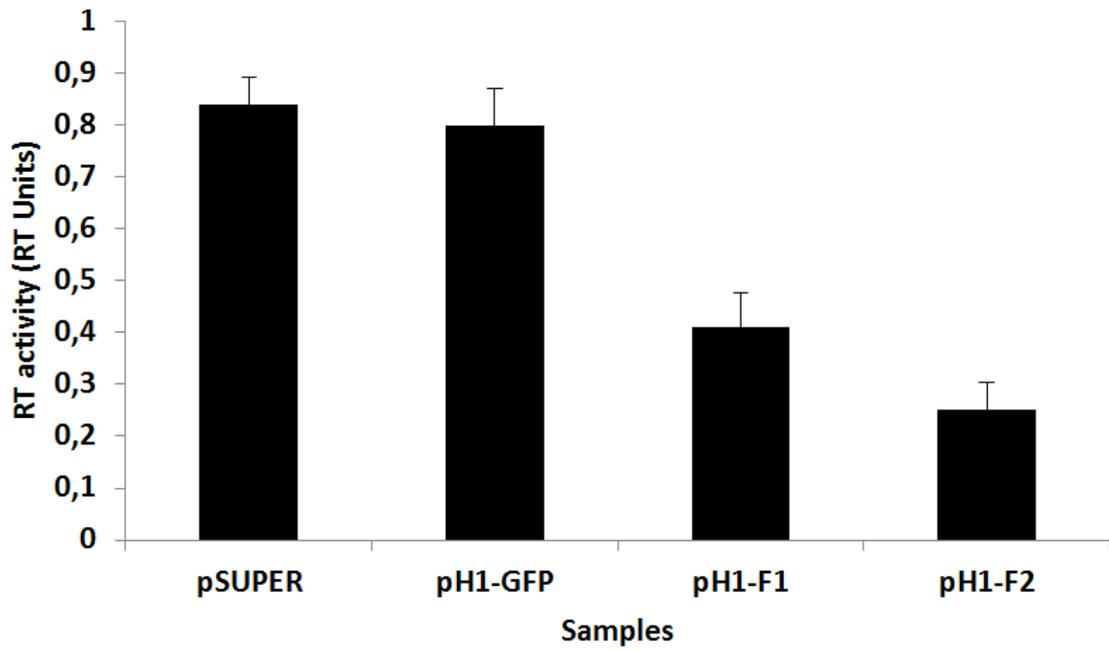


Figure 2.

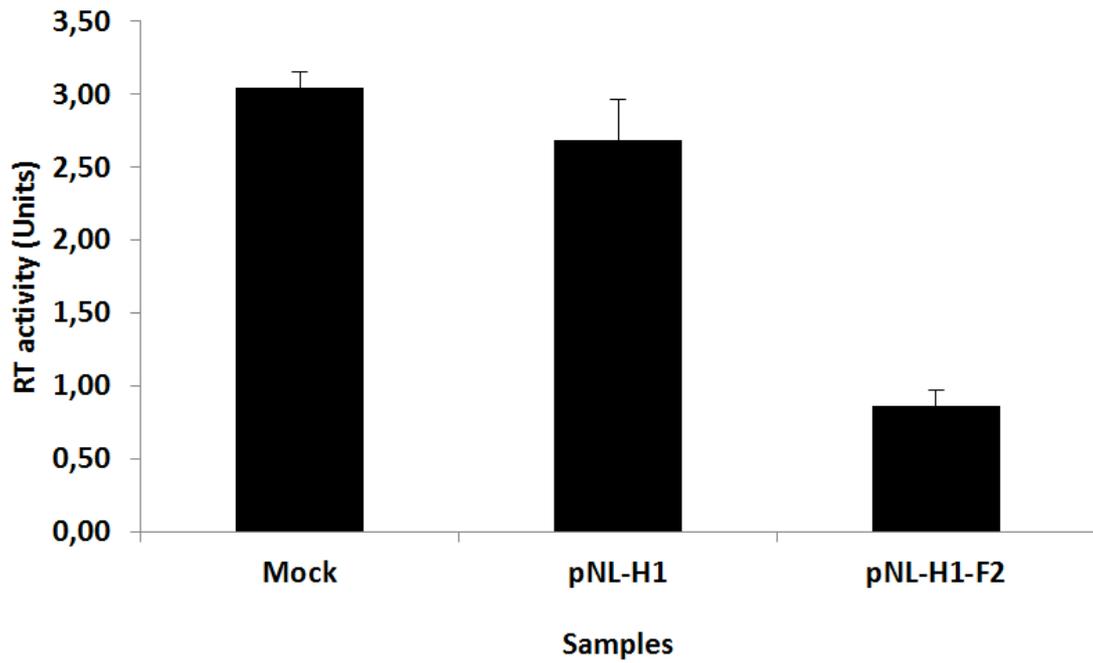


Figure 3.

Supplementary data

[Insert supplementary data here, OR if supplementary data is in separate files, list files here]

