

LUCIANA WANDERLEY MYRRHA

**FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO *Feline Coronavirus* (FCoV) EM
GATOS DOMÉSTICOS (*Felis Catus*) NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

LUCIANA WANDERLEY MYRRHA

**FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA DO Feline Coronavirus (FCoV) EM GATOS
DOMÉSTICOS (*Felis Catus*) NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2011.

Prof. Abelardo Silva Júnior
(Co-orientador)

Dr^a. Ethel F. de Oliveira Peternelli
(Co-orientadora)

Prof. Maurício Resende

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

“O segredo do sucesso é a constância do propósito”.

Benjamin Disraeli

Dedico esta dissertação aos meus familiares, em especial meus pais e meu marido, que sempre confiaram em mim, e me ensinaram a não deixar que meus medos tomassem o lugar dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça de mais uma etapa alcançada;

À minha orientadora, Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo (DBB/UFV), meus sinceros agradecimentos por ter me dado a oportunidade e ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Agradeço também pelo apoio, pelas críticas e cobranças que contribuíram muito para meu crescimento profissional;

Ao Professor Abelardo Silva Junior (DVT/UFV), co-orientador, por sempre me apoiar com críticas e sugestões essenciais para o desenvolvimento desse trabalho;

À Professora Juliana Lopes Rangel Fietto (DBB/UFV), co-orientadora, pelas sugestões e auxílio de bancada;

À Dra. Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli (DBB/UFV), co-orientadora, pela revisão deste trabalho e principalmente pelo incentivo, confiança, amizade e por tornar o ambiente de trabalho irresistível;

Ao Professor Maurício Resende por ter cedido as amostras dos felinos domésticos, possibilitando a realização desse trabalho e pelas sugestões sempre enriquecedoras;

Ao Professor Luiz A. Peternelli (DET/UFV) pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao funcionário do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), Sr. Valdir, por apoiar o desenvolvimento desse trabalho deixando sempre material pronto para ser usado e pelo convívio agradável;

À Fernanda Miquelitto, grande amiga, por ter sido meu braço direito e esquerdo na realização dos experimentos e pelas horas agradáveis no laboratório;

Ao Pedro Marcus Vidigal pelas aulas de filogenia, ajuda incondicional nas análises filogenéticas e filogeográficas deste trabalho e pelo apoio e amizade com conselhos sempre úteis;

À Josi, Mari e Nati, amigas companheiras, pelo apoio incondicional;

Aos amigos do LIMA pela companhia, incentivo, conselhos e, principalmente, pela amizade;

Às minhas estagiárias, Yasmin e Érica, por estarem sempre presentes;

À Rosi, secretária do Programa de Pós-graduação em Veterinária, pela atenção e boa vontade;

À Tania Mara e Fabiana Magalhães Coelho do Laboratório de Virologia Comparada (LCV-UFMG) por incentivarem esse trabalho e sempre me auxiliarem nas horas de aperto;

Aos meus pais e familiares pelo carinho e apoio que me ajudaram a concretizar esta etapa da minha vida;

A meu marido, Rodrigo, pela paciência e pelo incentivo que foram o suporte necessário para que eu pudesse terminar.

Aos veterinários que contribuíram neste estudo com o fornecimento de amostras;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

INDÍCE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1

CAPÍTULO 1

The paradox of Feline Coronavirus (FCoV) pathogenesis: Review	6
Abstract	7
1.1 Introduction	7
1.2 Internal Mutation Theory	9
1.3. Hypotheses related viral and host factors in the FCoV pathogenesis	14
<i>1.3.1 Quasispecies theory</i>	14
<i>1.3.2. Immune response related to viral-host interaction</i>	15
<i>1.3.3. Distinctive circulating virulent and avirulent strains</i>	22
1.4 Conclusion	22
1.5 References	23

CAPÍTULO 2

Confrontando a teoria da mutação do <i>Feline Coronavirus</i> (FCoV): estudo filogeográfico e dissociação da diversidade genética do gene 7b com a patogênese viral	32
--	----

2.1 Introdução	33
2.2 Metodologia	35
2.2.1 <i>Animais e coleta das amostras</i>	35
2.2.2 <i>Extração do RNA total</i>	37
2.2.3 <i>Oligonucleotídeos iniciadores (OI)</i>	38
2.2.4 <i>Síntese do cDNA – transcrição reversa (RT)</i>	40
2.2.5 <i>Semi-nested PCR para amplificação do gene 7b</i>	40
2.2.5.1 <i>Primeira reação (OI externos) e Segunda reação (OI internos)</i>	40
2.2.6 <i>Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento genético</i>	41
2.2.7 <i>Análise das sequências do gene 7b</i>	42
2.2.7.1 <i>Montagem dos contigs do gene 7b</i>	42
2.2.7.2 <i>Busca de sequências em banco de dados</i>	42
2.2.7.3 <i>Análises filogenéticas</i>	44
2.2.7.4 <i>Agrupamento das sequências em haplótipos</i>	44
2.2.8 <i>Análise estatística</i>	45
2.3 Resultados	46
2.3.1 <i>Ocorrência do FCoV na população estudada</i>	46
2.3.2 <i>Análise filogenética e filogeográfica</i>	49
2.4 Discussão	59
2.5 Conclusão	63

2.6 Referências bibliográficas.....	63
CONCLUSÕES GERAIS.....	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1.1 – Schematic representation of FCoV's genome.....	7
---	---

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Representação esquemática da posição dos oligonucleotídeos iniciadores externos e internos em relação ao gene 7b do genoma do FCoV.....	39
Figura 2.2. Amplificação do gene 7b do FCoV obtidos de amostras de plasma de gatos domésticos.....	46
Figura 2.3. Principais sinais clínicos observados no grupo de animais com algum sinal clínico sugestivo de PIF (grupo D).....	47
Figura 2.4. Rede de haplótipos e polimorfismo das amostras brasileiras do FCoV.....	51
Figura 2.5. Rede de haplótipos do FCoV.....	55
Figura 2.6. Classificação filogenética do FCoV com base no gene 7b.....	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1.1. Hypotheses regarding the FIP pathogenesis.....	9
---	---

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Distribuição do número de amostras de sangue total dos gatos	
--	--

domésticos de acordo com os locais onde foram coletadas.....	36
Tabela 2.2. Oligonucleotídeos iniciadores externos e internos usados para amplificação completa do gene 7b.....	38
Tabela 2.3. Sequências completas do gene 7b do genoma do FCoV selecionadas no NCBI com seus respectivos países de origem e ano de isolamento.....	43
Tabela 2.4. Caracterização da população de gatos domésticos estudada.....	48
Tabela 2.5. Descrição das sequências do gene 7b do FCoV obtidas das amostras brasileiras.....	49
Tabela 2.6. Haplótipos formados a partir de sequências completas do gene 7b de diferentes regiões geográficas.....	54

RESUMO

MYRRHA, Luciana Wanderley, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Filogenia e filogeografia do *Feline coronavirus* (FCoV) em gatos domésticos (*Felis catus*) naturalmente infectados.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O *Feline coronavirus* (FCoV) é um vírus envelopado de RNA fita simples, pertencente a família *Coronaviridae* e a ordem *Nidovirales*. Esse vírus é um importante patógeno de felinos domésticos e selvagens e pode causar uma inaparente ou leve infecção entérica e também causar uma doença imunomediada e fatal denominada peritonite infecciosa felina (PIF). A causa precisa da PIF ainda é desconhecida, mas algumas hipóteses são sugeridas. A hipótese mais aceita é a teoria da mutação interna que sugere que um biotipo menos virulento do FCoV (FECV), daria origem a outro biotipo mais patogênico (FIPV), capaz de infectar monócitos e macrófagos levando a PIF. Entretanto, apesar de ser a mais citada, ainda existem incertezas da relação do genoma do FCoV com o fenótipo da doença. Este trabalho, apresenta uma revisão com as diferentes pesquisas que tentam elucidar as teorias existentes sobre a patogênese da infecção pelo FCoV e testa, por meio de abordagens filogenética e filogeográfica, o gene 7b das primeiras sequências brasileiras de FCoV de gatos assintomáticos e sintomáticos, a fim de estudar, a correlação entre a diversidade genética desse gene e a diferenciação dos dois biotipos (FIPV e FECV). O gene 7b se mostrou altamente conservado entre os isolados virais e não houve diferenciação, na análise filogenética e filogeográfica, dos biotipos FIPV e FECV, pondo em questionamento a teoria da mutação.

ABSTRACT

MYRRHA, Luciana Wanderley, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2011. **Phylogeography and phylogeny of *Feline coronavirus (FCoV)* in domestic cats (*Felis catus*) naturally infected.** Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli and Juliana Lopes Rangel Fietto.

The Feline coronavirus (FCoV) is an enveloped virus RNA single-stranded, which belongs to the family *Coronaviridae* and the order *Nidovirales*. This virus is an important pathogen of wild and domestic cats and can cause a mild or inapparent enteric infection and also a rare and fatal disease called feline infectious peritonitis (FIP). The precise cause of FIP is still unknown but some hypotheses are suggested. The most accepted hypothesis is the theory of internal mutation that suggests a less virulent biotype of FCoV (FECV), would lead to other more pathogenic biotype (FIPV), capable of infecting monocytes and macrophages leading to FIP. However, despite being the most mentioned, there are still uncertainties in the relationship of the FCoV genome with the disease phenotype. This work presents a review from different FCoV studies attempt to elucidate existing theories on the pathogenesis of FCoV infection and tested through phylogenetic and phylogeographic approaches, the 7b gene of the first Brazilians FCoV sequences of asymptomatic and symptomatic cats in order to study the correlation between genetic diversity of this gene and differentiation of the two biotypes (FECV and FIPV). The 7b gene was shown to be highly conserved among the isolates and there was no differentiation between FIPV and FECV biotypes in phylogeographical and phylogenetic analysis, calling into question the theory of mutation.

INTRODUÇÃO GERAL

O *Feline coronavirus* (FCoV) é um vírus pertencente a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e gênero *Alphacoronavirus* (Woo et al., 2010). Os vírus dessa família são envelopados e possuem genoma RNA fita simples, polaridade positiva, com tamanho que varia de 27 a 32 kilobases (Kb) (Lai and Cavanagh, 1997).

O FCoV possui distribuição mundial e é um importante patógeno de felinos domésticos e selvagens por levar à peritonite infecciosa felina (PIF), uma doença fatal de difícil diagnóstico e prevenção (Pedersen, 2009).

A PIF é uma enfermidade imunomediada sistêmica que pode ter duas apresentações clínicas, forma efusiva (úmida) e não efusiva (seca). A forma efusiva é caracterizada por derrame cavitário (ascite ou hidrotórax) e a forma não-efusiva por anorexia, perda de peso, icterícia, febre recorrente, irite e sinais neurológicos (Timmann et al., 2008). Esses sinais estão associados a lesões granulomatosas de órgãos parenquimatosos como os rins, linfonodos mesentéricos, fígado, sistema nervoso central e olhos (Kipar et al., 2005).

A transmissão do FCoV é feita através do contato dos animais susceptíveis com as secreções oronasais e fezes (Pedersen, 2009), sendo essa última a maior fonte de contaminação (Addie and Jarrett, 2001).

Os FCoVs são subdivididos em dois sorotipos, tipo I e tipo II (Pedersen et al., 1984), baseados em ensaios sorológicos para a proteína imunogênica de superfície *Spike* (S) (Shiba et al., 2007) e análises moleculares do gene para essa mesma proteína (Motokawa et al., 1995). O sorotipo I é predominante na população felina acometida pelo FCoV, entretanto, a sua associação com a PIF ainda é controversa (Pedersen, 2009).

Além dos dois sorotipos, são descritos dois biotipos do FCoV, que variam quanto à sua patogenicidade, sendo eles o *Feline infectious peritonitis virus* (FIPV) que causa a PIF e o *Feline enteric coronavirus* (FECV) que leva a uma infecção entérica leve ou subclínica. Estudos sugerem que o FIPV surge de uma mutação durante a replicação intestinal do FECV (Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998) e que essas mutações se concentram em genes para a proteína estrutural S (Rottier et al., 2005), e não estruturais 3c (Chang et al., 2010; Pedersen et al., 2009) e 7b (Herrewegh et al., 1995; Pedersen, 2009; Vennema et al., 1998). Entretanto, nenhuma mutação específica foi identificada nos 29 Kb do genoma do FCoV para a transição do FECV para o FIPV (Dye and Siddell, 2007).

No Brasil, a bibliografia sobre o estudo do FCoV é escassa. Existem poucos relatos para gatos domésticos (Johann et al., 2009; Oliveira et al., 2003), entretanto sem abordar a caracterização molecular e filogenética desse vírus.

Nesse sentido, estudos da diversidade genética são fundamentais para melhor compreensão da genealogia dos isolados e são de extrema importância para responder a questões que ainda precisam ser elucidadas como a correlação das variações genéticas observadas no genoma com a virulência dos diferentes isolados de FCoVs.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo revisar as diferentes teorias com relação a patogênese da PIF e estudar o gene 7b de isolados virais brasileiros de FCoV de gatos domésticos (*Felis catus*) assintomáticos e sintomáticos por meio de abordagens filogenéticas e filogeográficas.

Referências Bibliográficas

Addie, D.D., Jarrett, O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. **Veterinary Record**, v. 148, n. 21, p. 649-653, 2001.

Chang, H.W., de Groot, R.J., Egberink, H.F., Rottier, P.J. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. **Journal of General Virology** v. 91, n. Pt2, p. 415-420, 2010.

Dye, C., Siddell, S.G. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 3, p. 202-213, 2007.

Herrewegh, A.A., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., de Groot, R.J. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 622-631, 1995.

Johann, J.M., Caetano, C.F., Hass, R., Guim, T.N., Fischer, G., Vargas, G.D., Vidor, T., Hübner, S.O. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 752-754, 2009.

Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W., Reinacher, M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 3, p. 321-330, 2005.

Lai, M. M. C.; Cavanagh, D. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v.48, n.2-4, p.1-100, 1997.

Motokawa, K., Hohdatsu, T., Aizawa, C., Koyama, H., Hashimoto, H. Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. **Archives of Virology**, v. 140, n. 3, p. 469-480, 1995.

Oliveira, F.N., Raffi, M. B., Souza, T. M., Barros, C.S.L. Peritonite infecciosa felina: 13 casos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 905-911, 2003.

Pedersen, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 4, p. 225-258, 2009.

Pedersen, N.C., Black, J.W., Boyle, J.F., Evermann, J.F., McKeirnan, A.J., Ott, R.L. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 173, p. 365-380, 1984.

Pedersen, N.C.L., H.; Dodd, K. A.; Pesavento, P. A. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. **Viruses**, v. 1, n. 2, p. 166-184, 2009.

Rottier, P.J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H., Haijema, B.J. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14122-14130, 2005.

Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M., Iwata, H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3-4, p. 348-352, 2007.

Timmann, D., Cizinauskas, S., Tomek, A., Doherr, M., Vandeveld, M., Jaggy, A. Retrospective analysis of seizures associated with feline infectious peritonitis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n.1, p. 9-15, 2008.

Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N.C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. **Virology**, v. 243, n.1, p. 150-157, 1998.

Woo, P.C.Y., Huang, Y., Lau, S.K.P., Yuen, K-Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v.2, n.8, p.1804-1820, 2010.

CAPÍTULO 1

The paradox of Feline coronavirus (FCoV) pathogenesis:

Review

Abstract

Feline coronavirus (FCoV) is an enveloped single-stranded RNA virus, of the family *Coronaviridae* and the order *Nidovirales*. FCoV is an important pathogen of wild and domestic cats and can cause a mild or apparently symptomless enteric infection, especially in kittens. FCoV is also associated with a lethal, systemic disease known as feline infectious peritonitis (FIP). Although the precise cause of FIP pathogenesis remains unclear, some hypotheses have been suggested. In this review we present results from different FCoV studies and attempt to elucidate existing theories on the pathogenesis of FCoV infection.

1.1 Introduction

Feline coronavirus (FCoV) belongs to the family *Coronaviridae* and the order *Nidovirales* [1], and affects both wild and domestic cats [2]. FCoV contains a positive polarity RNA genome approximately 29 kb in length, consisting of 11 open reading frames (ORF). Two major ORFs encode a replicase, four ORFs encode the structural proteins S (spike), E (envelope), M (membrane) and N (nucleocapsid), and five ORFs encode the nonstructural proteins 3a, 3b, 3c, 7a and 7b (Figure 1.1) [3].

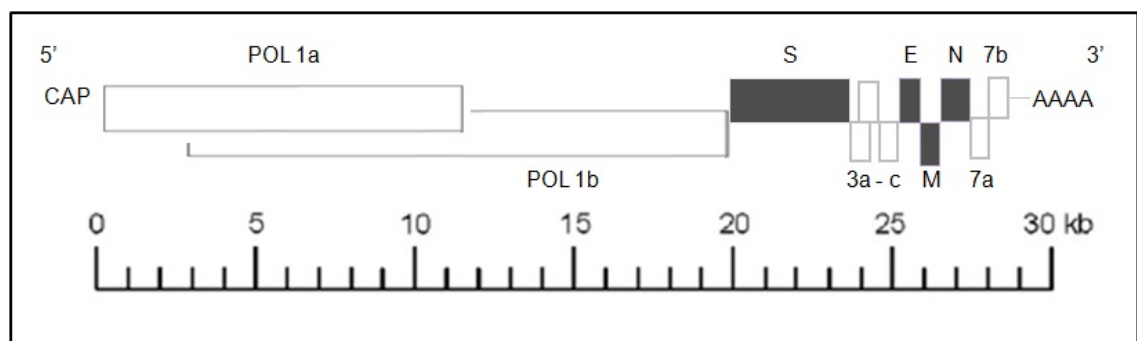


Figure 1.1 – Schematic representation of FCoV's genome [26].

FCoV can cause a mild or sometimes apparently symptomless enteric infection, especially in kittens, and is also associated with a lethal, systemic disease known as feline infectious peritonitis (FIP) [4, 5]. FIP is characterized by fibrinous, granulomatous serositis, with protein-rich effusions in the body cavities of affected cats (effusive or “wet” FIP), as well as granulomatous-necrotizing lesions, periphlebitis and granulomatous inflammatory lesions in several organs, especially, liver, kidney, spleen, leptomeninges and eyes (non-effusive or “dry” FIP) [6].

Although the precise cause of FIP pathogenesis is still unknown, several hypotheses have been suggested. One assumption is that a mutant FCoV strain is able to infect monocytes and macrophages, leading to FIP [7-9]. This mutant virus strain has been named feline infectious peritonitis virus (FIPV), whereas the strain that causes enteric infection was named feline enteric coronavirus (FECV) [7, 10-12]. Because FIPV and FECV cannot be distinguished by their antigenicity, or even by genome sequence analysis, they are considered to be two, distinctly different pathotypes, which differ only in their pathogenicity [11, 12]. In fact, although this hypothesis is known as the internal mutation theory, no specific mutation has been identified in the 29 kb FCoV genome [13].

A second hypothesis for the development of FIP proposes that any FCoV strain can cause FIP disease. Instead, host factors, such as immune response variations [13-16] and viral factors, such as the formation of quasispecies [17], determine whether or not FIP develops.

Brown and co-authors [18] have proposed yet a third hypothesis for FIP pathogenesis. These authors suggest, after phylogenetic analyses, of the partial

membrane gene and the partial nonstructural protein 7b gene from sequences from healthy cats and sick cats that, possibly, there are two different strains, virulent and avirulent, circulating in natural feline population and FIP development occurs when an animal is infected with the virulent strain.

Thus, to date, many experimental studies and different hypothesis have been reported in the literature attempting to explain FIP pathogenesis (Table 1.1). This review, therefore, presents these different research studies and attempts to elucidate existing theories on the pathogenesis of FCoV infection.

Table 1.1 Hypotheses regarding the FIP pathogenesis.

Theory	References
Internal mutation theory	[2, 5, 7, 9, 19-21, 23-26, 29]
Quasispecies theory	[13, 17, 35]
Immune response related to viral-host interaction	[6, 11, 14, 16 31, 36, 40-46, 48-60, 62-64, 67-70]
Distinctive circulating virulent and avirulent strains	[18]

1.2 Internal Mutation Theory

The close similarity of FECV to FIPV, and the low incidence of FIP, despite the high proportion of FCoV seropositive cats, led to the hypothesis that FECV carriers are sources of FIPV, which is proposed to be generated by small mutations in FECV [5, 19]. After this hypothesis was first postulated in the literature, several studies have been conducted to test its validity.

Initially, this mutational theory was questioned, when the 3' ends of the genomes (the corresponding ORF7a/7b) of an FIPV strain, which had been adapted to tissue culture (strain WSU 79-1146), and an FECV strain (strain WSU 79-1683) were genetically compared. FECV was shown to contain a 238 nucleotide deletion in ORF7b [20], in contrast to what might be expected if FIPV were indeed a mutant of FECV. According to Vennema and co-authors [20], it is possible that both FECV and avirulent FIPV strains are derived from FIP inducing strains, but have been attenuated by the loss of virulence factors. The authors further propose that recombination of two attenuated viruses during a rare mixed infection event could result in the resurgence of a virulent FIPV strain.

Evidence in support of the mutation theory came from comparative analysis of 1.2 kb genomic fragments obtained from nine additional FECV and FIPV isolates [21]. All of these isolates were found to have intact ORF7bs, indicating that the deletion observed in FECV 79-1683 is associated with adaptation to cell culture. These results are in agreement with previous studies that showed that four strains of FCoV (79-1683, TN406-HP, UCD2 and ts-DF2) with deletions in ORF7b were avirulent [22, 23]. Thus, it is likely that, for these viruses, ORF7b deletions contribute to the loss of virulence. Therefore, ORF7b seems to provide a distinct selective advantage during natural infection [21].

Because ORF7b deletions had been identified in previous studies, researchers began to assess the involvement of other regions of the genome in FCoV pathogenicity. Subsequent studies have shown that both deletions and nonsense mutations within ORF3c and, less often, specific mutations in OFR7b, are present in FIPVs but not in FECVs [9]. Sequencing of attenuated derivatives of virulent FIPV

strains, show good correlation between deletions in ORF7b and attenuation of virulence [21]. This latter observation indicates that the 7b protein encoded by ORF7b is important for virulence. Thus, the virulence-associated ORF7b may be somewhat suppressed in FECVs not adapted to tissue culture, and the presence of an intact ORF3c in these FECVs may be involved in this suppression. Moreover, two cats from the same household were found to contain distinct ORF3c deletions, demonstrating that these two FIPVs were independently derived from FECV and not transmitted horizontally [9].

Kennedy and co-authors [24] analyzed ORF7a and ORF7b in cheetah FCoV isolates over a period of 4 years. In most isolates, a deletion mutation was observed in ORF7a that results in an open reading frame change, possibly leading to expression of an aberrant ORF7a product, or loss of ORF7a expression. In addition, although specific mutations were also found in ORF7b, these mutations would not result in important changes within the resulting protein, suggesting that this protein may be essential for viral replication or infection [24].

Subsequent analysis of ORF7a and ORF7b revealed two distinct virus variants circulating in a population of 15 Persian cats; one with ORF7a intact and the other with two major deletions (nucleotides 20-120 and nucleotides 164-226) in ORF7a [25]. ORF7b was intact and similar among all isolates, but specific mutations resulted in changes in ORF7b protein amino acids. Some cats in this study were doubly infected with both viral variants. Because the cats were exposed to both variants, the authors concluded that there must be a causal relationship between the occurrence of these mutations and the increased incidence of FIP in this population [25]. According to these authors, in addition to the viral variant, disease variation

must be related to host factors, such as the ability of the host to generate an effective immune response.

Alternatively, many authors have proposed that mutations in other genomic regions might be responsible for the variation in virulence observed in FCoV strains [8, 26]. Specifically, analysis of the 5' hypervariable region of the S gene revealed consecutive accumulation of nucleotide substitutions non-synonymous in this region, suggesting sequential emergence of viral variants, each time replacing the pre-existing virus population as a result of immune selection during chronic infection [26].

Because deletions in ORF7b were previously identified in laboratory strains with variable numbers of passages, these were considered to be associated with loss of virulence [20, 21, 27]. In contrast to these previous findings, sequence comparisons of FCoV ORF7bs isolated from some cats with FIP, revealed small, in-frame deletions in the 3' region of ORF7b, implying that the presence of this deletion is not correlated with FIP pathogenicity [28].

Studies have also shown that ORF3c presents great genetic variability in cats with FIP [2, 29]. The expression of functional ORF3c protein is crucial for FECV replication in the gut, but dispensable for systemic FIPV replication [29]. It was observed that ORF3c is intact in all strains of FECVs, but is mutated in most FIPV strains. However, as some FIPVs seem to have intact ORF3c, it is likely that 3c mutations are not the only cause of FIP [2, 29].

To investigate the genetic differences that may result in the increased pathogenicity of FIPV with respect to FECV, Dye and Siddell [13] compared the

complete sequences of viral RNA samples extracted from the liver and jejunum of a cat with classical FIP, and observed 100% identity between them, calling into question the internal mutation theory. However, studies in support of this theory contend that, because deleterious ORF3c mutations tend to be found in the tissues of sick animals, while intact ORF3c is found mainly in feces [2], fecal samples of FIPV may be present as a result of extensive intestinal lesions, which could explain the presence of the FIPV in the jejunum in the experiments carried out by Dye and Siddell [29].

Sequence comparisons also show that FECVs and FIPVs taken from cats in the same geographical area are closely related, whereas there are significant genetic variations between FECVs and FIPVs from different geographic areas [2, 9]. According to these authors, the high genetic similarity between FIPV and FECV isolates from cats of the same geographic region strongly suggest a common ancestor. Furthermore, the occurrence of deleterious mutations in FIPVs, but not in FECVs, is believed to confirm the hypothesis that FIPVs emerged from FECVs.

The theory that FIPVs originated from mutations in FECVs was reinforced by studies of experimental infection. Cats experimentally infected with an FECV RM strain [7] remained asymptomatic during the first 2 months post-infection, but 8 to 10 weeks post-infection, 2 cats developed FIP. Viruses isolated from these two cats (FIPV-UCD9 and FIPV-UCD10) were found to have high sequence identity with each other and with FECV-RM, and induced FIP when inoculated intraperitoneally in specific pathogen free (SPF) cats [7]. This study showed that FIPVs can rapidly arise by mutations in FECVs and that these mutations frequently occur, although

another study showed that cats persistently infected by FECV rarely develop FIP [30].

According to Kipar and co-authors [31], an increase in viral replication capacity may be a key feature in the development of FIP. Failure to control FCoV replication could lead to an increase in viral load, thus increasing the chances that a pathogenic mutation will be generated [26]. Furthermore, immunosuppression caused by infection with feline leukemia virus (FELV) or feline immunodeficiency virus (FIV) can reinforce the creation and selection of mutant FIPVs by increasing the rate of FECV replication in the gut and inhibiting the ability of the host to fight mutated viruses once they are formed. Thus, both viral and host factors determine the outcome of FCoV infection [4, 7].

1.3 Hypotheses related viral and host factors in the FCoV pathogenesis

1.3.1 Quasispecies theory

Viruses with RNA genomes have high mutation rates during development and larger viral genomes have higher mutation rates compared with smaller genomes. This fact, coupled with its rapid and continuous replication, allows for rapid production of viral genetic diversity, including mutations that facilitate adaptation to the host [32].

The high mutation rates in viruses with RNA genomes which use RNA polymerase dependent RNA, occur because of the absence of proofreading activity in this enzyme. In coronavirus, although it's RNA polymerase has a domain with exoribonuclease 3'-5' activity [33], a high number of errors still can occur in the genome, giving rise to a population of heterogeneous closely related sequences

called quasispecies [17]. In the coronaviruses, quasispecies formation has been well documented for murine hepatitis virus (MHV) [34].

FCoV can also form quasispecies with significant genetic heterogeneity, as a result of accumulation of mutations during viral replication [17, 35, 36]. These viral subpopulations were analyzed by single-strand conformational polymorphism (SSCP), for polymerase chain reactions (PCR) products of genes N and 7b [17, 36]. These studies demonstrate that the composition of FCoV quasispecies in a single cat can differ in different organs [17, 36], and that the heterogeneity of the FCoV genome is related to the severity and clinical form of FIP and the lesions observed in the organs of affected animals [17]. New viral strains present in these subpopulations can alter cell tropism and pathogenicity, and may have a significant impact on generating host disease [13]. However, it still remains unclear if the association between genetic diversity and pathogenesis can be attributed to quasispecies dynamics [32]. Moreover, the mere observation of high levels of genetic variation in RNA viruses is not proof of the existence of quasispecies. To demonstrate that RNA viruses form quasispecies, it is necessary to prove that natural selection acts on the viral population as a unit [37].

1.3.2 Immune response related to viral-host interaction

An important feature of FCoV pathogenesis is the intrinsic resistance of macrophages to FCoV infection [38]. It has been postulated that the emergence of highly virulent FIPV biotypes from FECV is accompanied by a dramatic change in cell tropism that allows FIPV to infect monocytes, and then be disseminated systemically [8, 10, 39].

Macrophages infected with FIPV play a key role in the immunopathological damage observed in FIP. These cells are the most predominant inflammatory cells in FIP lesions [40] and viral antigens can be detected in macrophages isolated from pyogranulomatous lesions [41] and in monocytes (progenitors of tissue macrophages) isolated from effusions [42]. Moreover, the decrease of CD4 T cells and, especially, CD8 T cells, as a result of apoptosis, is probably related to tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) released by macrophages infected with FCoV [11].

Probably, FIPV replicates in monocytes and macrophages because these cells do not express viral antigens on their surface, creating a form of escape through the humoral immune system [43]. However, FIPV-like cell tropism by macrophages is also observed for FECV, because this biotype is also capable of infecting monocytes and macrophages [14, 44]. Furthermore, cats that do not present with any clinical or pathological evidence of FIP can maintain viremia in their monocytes for a period of 3 to 12 months [16, 36, 44], indicating that the development of FIP is not dependent on the systemic spread of FCoV [16] and that the susceptibility of monocytes/macrophages to FCoV infection is only one of the pathogenic events responsible for FIP. Kipar and co-authors [31] showed that, independent of the development of FIP, infection by FCoV induces proliferation and activation of monocytes/macrophages.

Host genetic factors are also important for the susceptibility of monocytes to FCoV infection. Studies in vitro showed that monocytes from different cats do not have the same susceptibility to FCoV infection (by the same strain of FCoV) suggesting that cellular factors, influenced by genetic background and/or differentiation/activation status, are very important in determining the occurrence of

FIP [14, 45]. This resistance to FCoV infection seems to occur also in natural infections. A study in vivo showed that a small percentage of cats in FCoV endemic households had no shedding and remained seronegative or had a low antibody titer over a time period of 5 years [46].

An ineffective immune response against FCoV infection seems to be an important factor in FIP pathogenesis [36]. It has been hypothesized that animals with a weak cell-mediated immunity (CMI) in combination with a strong humoral immune response are likely to develop FIP and cats with a strong CMI may not develop the disease [47].

There are indications that a strong humoral immune system plays an adverse role in the development of FIP [48-50]. The antibody titer, in FIPV infection, is not effective for elimination of the virus, and, inversely, they enhance FIP development in vitro [48] and in vivo, in cats previously immunized against FCoV [50, 51]. The phenomenon antibody-dependent enhancement (ADE) could explain this accelerated development of FIP in the presence of antibodies. In ADE, antibodies might help the spread of the virus in an infected cat by facilitating the virus uptake through the formation of virus-antibody complexes that are taken up by uninfected monocytes/macrophages via the Fc receptor [49]. A recent study in vitro, showed that viral plasma membrane-bound proteins of FCoV (S and M) were internalized by monocytes upon antibody addition [52].

Differently, it has been proposed that ADE does not occur in cats with strong CMI, even if they possess anti-FCoV antibodies, escaping from FIP development [50].

Significant differences found in the composition and functional state of lymphatic tissues from FCoV infected cats, with and without clinical signs of FIP, have been proposed to play an important role in FIP pathogenesis [31, 45, 53, 54].

Cats infected with FCoV, but without clinical signs of FIP, generally exhibit B and T cells hyperplasia with high lymphocyte proliferation [53- 55], and exhibit higher expression levels of feline interleukin (IL)-10 in the spleen, as shown by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In addition, these cats have decreased IL-6 levels [31]. In contrast, Takano and co-authors [56] showed that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from FIP cats displayed higher IL-6 expression compared to the same cells from SPF cats and suggest that IL-6 is involved in the development of immune-complex-mediated vasculitis and, therefore, in FIP pathogenesis. This is probably due to the action of IL-6 in recruit and activates T-cells and macrophages, in expand cytotoxic T-lymphocytes, in modulation plasma cell differentiation and increase vascular permeability [57]. In the central nervous system IL-6 contributes to immune-mediated destruction observed in this tissue from cats with neurological clinical sings of FIP [57].

IL-6 is negatively regulated by IL-10 [58]. IL-10 stimulates Natural killer cells, positively regulates the expression of Fc γ I receptors and antibody-dependent cellular cytotoxicity. This cytotoxicity probably contributes to viral elimination [59] and to the low viral loads observed in asymptomatic, FCoV carrier cats [15]. However, another study reported that high viral load is not related to the development of FIP [16]. Furthermore, IL-10 negatively regulates the expression of β 2-integrins on monocytes, reducing their ability to adhere to endothelial cells and causing vasculitis [6]. However, the role of IL-10 in protection against FIP requires

further study, because Dean and co-authors [60] observed high IL-10 expression levels in tissues of cats infected with a highly pathogenic FIPV strain (FIPV UCD8).

Lymphoid depletion has been reported in lymphatic tissues [54, 60] and in blood [55] of FCoV infected animals, with clinical signs of FIP. This lymphoid depletion is likely due to apoptosis, probably mediated by TNF-alpha release, infected macrophages and significantly decreased IL-12 p40 expression [31, 60]. This decrease in IL-12 p40 coupled with the presence of large numbers of activated macrophages in the lymphatic tissue and granulomatous infiltrates are signs of immune response failure [31]. IL-12 and Interferon (IFN)-gamma coordinate the link between pathogen recognition by innate immune cells and the induction of specific immunity, by mediating a positive feedback to amplify the Th1 response (cell-mediated). IFN-gamma is an important cytokine for the Th1 immune response by inducing effector mechanisms such as innate cell-mediated immunity, specific cytotoxic immunity, and macrophage activation [61].

Cytokine mRNA measurements from PBMC from cats previously immunized with an avirulent FIP strain (FIPV-UCD1), then challenge-exposed to a highly virulent cat passaged strain (FIPV-UCD8) with classical effusive FIP and non-effusive FIP showed that disease, regardless of form, is associated with a strong TNF-alpha mRNA response in PBMC and a failure to induce IFN-gamma mRNA. In contrast, asymptomatic cats of the same study failed to upregulate TNF-alpha mRNA and were observed in one asymptomatic cat strong IFN-gamma mRNA responses [62].

TNF-alpha mRNA response tends to favor Th2 immunity (humoral), while the IFN-gamma mRNA responses favors Th1 immunity [62]. In FCoV-endemic cattery without a case of FIP the percentage of clinically healthy FCoV-positive cats expressing IFN-gamma is significantly high, suggesting that this cytokine, together with IL-1 β , might protect infected cats from the disease [63].

Differently, another study showed high levels of IFN-gamma mRNA in tissues with inflammatory lesions of FIP indicating that the infection is not controlled only by the inflammatory response [40]. According to these authors, probably, cytokine profiles that run on samples from tissues with relevant inflammatory lesions could reflect the local cytokine response more adequately than in PBMC. A study with cats naturally infected with FCoV with clinical FIP and FCoV-infected clinically normal animals showed that cats with FIP do not have increased serum IFN-gamma concentrations [64] suggesting low IFN-gamma expression by PBMC like mentioned by Berg and co-authors [40] or depleted numbers of lymphocytes in the blood or lymph nodes [54].

Moreover, cats naturally infected with FCoV, with clinical effusive FIP had IFN-gamma concentrations in the effusions 40-fold higher than the serum concentrations of this cytokine in the same animals [64]. This suggests that the IFN-gamma present in the effusions is produced by cells within FIP lesions, as reported by Berg and co-authors [40].

A recent study with cats naturally infected with FCoV and with clinical effusive FIP showed low serum IFN-gamma concentrations. High serum IFN-gamma concentrations in cats clinically normal and high IFN-gamma concentration of the

FIP effusions. This suggest that although cats resistant to FCoV infection have strong CMI as measured by serum IFN-gamma production, CMI is also likely to be involved in the pathogenesis of FIP, albeit at a tissue level, as evidenced by the high IFN-gamma concentration of the FIP effusions [64].

Another important factor involved in the pathogenesis of FIP is systemic inflammatory reaction. Acute phase proteins (APP) are plasma proteins produced by hepatocytes during systemic inflammation [65]. The major feline APP is α 1-acid glycoprotein (AGP) [66]. In humans AGP is over expressed during systemic inflammatory responses and its function appears to be related to an immunomodulatory activity [65].

In cats with FIP it has been observed increase of AGP concentration [67-69] and this AGP is hyposialylated (decrease in the degree of sialylation, a post-translational modification) [68]. The decrease in the degree of sialylation is important for development of FIP. In catteries with endemic FCoV all cats respond to increased viral burden by increasing the production of AGP but only cats with hyposialylated AGP have persistently increased AGP levels and develop FIP [67]. Paltrinieri and co-authors [70] investigated the sialylation pattern of serum AGP in non-symptomatic cats infected by FCoV and its relationship with the amount of FCoVs shed in faeces and observed that hypersialylation of AGP may be one of the factors that could explain why FCoV-infected cats do not develop FIP in spite of the presence of large amount of viral RNA shed in the environment. Possibly, the hypersialylation provides protection from the development of FIP [70].

1.3.3 Distinctive circulating virulent and avirulent strains

Recently, Brown and co-authors [18] formulated a new hypothesis explaining FIP pathogenesis, which suggests the existence of two different strains, virulent and avirulent, circulating among feline populations. These authors performed phylogenetic analysis of partial sequences from ORFs M, S, 3c and 7b, isolated from FCoV carrier cats, with and without clinical signs of FIP. From this analysis, the authors inferred that FIPV and FECV form monophyletic groups, with high bootstrap values that clearly differentiate them genetically; supporting the presence of two circulating strains. However, more studies are needed using sequences from different geographic regions. In addition, further investigation is required into the correlation of these strains with host related factors, such as immune response, to confirm this hypothesis.

1.4 Conclusion

Despite numerous efforts by the scientific community to understand FIP pathogenesis, this disease still remains an enigma. As demonstrated in this review, the causes underlying FIP pathogenesis are probably multifactorial, with both viral and host factors as well as viral genetic determinants playing important roles in FIP pathogenesis. The studies necessary to show this interaction will likely be complex, because FCoV is an RNA virus, it is able to easily mutate, and thus there are many FCoV viral subpopulations with variations in different regions of its genome. In addition, individual cats may respond differently to FCoV infection, suggesting that the immune response to FIP is complex. Thus, by definition, both of the FIP pathogenesis theories presented in this review are too simplistic, and further studies

are essential to elucidate FIP pathogenesis, and to obtain information that will assist in the development more accurate diagnostic methods and effective vaccines.

1.5 References

1. de Vries, A.A.F., et al., The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. *Semin Virol*, 1997. 8(1): p. 33-47.
2. Pedersen, N.C., A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J feline Med Surg*, 2009. 11(4): p. 225-258.
3. Dye, C. and S.G. Siddell, Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol*, 2005. 86(Pt 8): p. 2249-2253.
4. Pedersen, N.C., Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 1987. 218: p. 529-550.
5. Pedersen, N.C., Animal virus infections that defy vaccination: equine infectious anemia, caprine arthritis-encephalitis, maedi-visna, and feline infectious peritonitis. *Adv Vet Sci Comp Med*, 1989. 33: p. 413-428.
6. Kipar, A., et al., Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol*, 2005. 42(3): p. 321-330.
7. Poland, A.M., et al., Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol*, 1996. 34(12): p. 3180-3184.

8. Rottier, P.J., et al., Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol*, 2005. 79(22): p. 14122-14130.
9. Vennema, H., et al., Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, 1998. 243(1): p. 150-157.
10. Pedersen, N.C., et al., An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 1981. 42(3): p. 368-377.
11. Takano, T., et al., A "possible" involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 2007. 119(2-4): p. 121-131.
12. Vennema, H., Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol*, 1999. 69(1-2): p. 139-141.
13. Dye, C. and S.G. Siddell, Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *J Feline Med Surg*, 2007. 9(3): p. 202-213.
14. Dewerchin, H.L., E. Cornelissen, and H.J. Nauwynck, Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol*, 2005. 150(12): p. 2483-2500.
15. Kipar, A., et al., Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg*, 2006. 8(1): p. 69-72.
16. Meli, M., et al., High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg*, 2004. 6(2): p. 69-81.

17. Battilani, M., et al., Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003. 39(2): p. 141-147.
18. Brown, M.A., et al., Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis*, 2009. 15(9): p. 1445-1452.
19. Pedersen, N.C., et al., Pathogenicity studies of feline coronavirus isolates 79-1146 and 79-1683. *Am J Vet Res*, 1984. 45(12): p. 2580-2585.
20. Vennema, H., et al., Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology*, 1992. 191(1): p. 134-140.
21. Herrewegh, A.A., et al., The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology*, 1995. 212(2): p. 622-631.
22. Christianson, K.K., et al., Characterization of a temperature sensitive feline infectious peritonitis coronavirus. *Arch Virol*, 1989. 109(3-4): p. 185-196.
23. Pedersen, N.C. and J.W. Black, Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res*, 1983. 44(2): p. 229-234.
24. Kennedy, M.A., et al., Analysis of genetic mutations in the 7a7b open reading frame of coronavirus of cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Am J Vet Res*, 2006. 67(4): p. 627-632.

25. Kennedy, M., et al., Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 2001. 81(3): p. 227-234.
26. Herrewegh, A.A., et al., Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*, 1997. 234(2): p. 349-363.
27. Haijema, B.J., H. Volders, and P.J. Rottier, Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol*, 2003. 77(8): p. 4528-4538.
28. Lin, C.N., et al., Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*, 2009. 11(6): p. 413-419.
29. Chang, H.W., et al., Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol*, 2010. 91(Pt 2): p. 415-420.
30. Pedersen, N.C., C.E. Allen, and L.A. Lyons, Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg*, 2008. 10(6): p. 529-541.
31. Kipar, A., et al., Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006. 112(3-4): p. 141-155.
32. Holmes, E.C., The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2009. 40: p. 353-372.

33. Minskaia, E., et al., Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(13): p. 5108-5113.
34. Makino, S., et al., High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J Virol*, 1986. 57(3): p. 729-737.
35. Gunn-Moore, D.A., et al., Detection of FCoV quasispecies using denaturing gradient gel electrophoresis. *Vet Microbiol*, 1999. 69(1-2): p. 127-130.
36. Kiss, I., et al., Preliminary studies on feline coronavirus distribution in naturally and experimentally infected cats. *Res Vet Sci*, 2000. 68(3): p. 237-242.
37. Moya, A., E.C. Holmes, and F. Gonzalez-Candelas, The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2004. 2(4): p. 279-288.
38. Morahan, P.S., J.R. Connor, and K.R. Leary, Viruses and the versatile macrophage. *Br Med Bull*, 1985. 41(1): p. 15-21.
39. Stoddart, C.A. and F.W. Scott, Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol*, 1989. 63(1): p. 436-440.
40. Berg, A.L., et al., Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Microbiol*, 2005. 111(1-2): p. 15-23.

41. Kipar, A., et al., Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998. 65(2-4): p. 243-257.
42. Paltrinieri, S., M.C. Parodi, and G. Cammarata, In vivo diagnosis of feline infectious peritonitis by comparison of protein content, cytology, and direct immunofluorescence test on peritoneal and pleural effusions. *J Vet Diagn Invest*, 1999. 11(4): p. 358-361.
43. Cornelissen, E., et al., Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Vet Microbiol*, 2007. 121(1-2): p. 131-137.
44. Gunn-Moore, D.A., T.J. Gruffydd-Jones, and D.A. Harbour, Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 1998. 62(3): p. 193-205.
45. Tekes, G., et al., Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *J Virol*, 2010. 84(3): p. 1326-1333.
46. Addie, D.D. and O. Jarrett, Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec*, 2001. 148(21): p. 649-653.
47. Pedersen, N.C., An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Fel Pract*, 1995. 23(3): p. 7-20.

48. Pedersen, N.C. and J.F. Boyle, Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 1980. 41(6): p. 868-876.
49. Hohdatsu, T., et al., A study on the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline macrophages by monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 1991. 120(3-4): p. 207-217.
50. Takano, T., et al., Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *J Vet Med Sci*, 2008. 70(12): p. 1315-1321.
51. Vennema, H., et al., Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *J Virol*, 1990. 64(3): p. 1407-1409.
52. Dewerchin, H.L., E. Cornelissen, and H.J. Nauwynck, Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *J Gen Virol*, 2006. 87(6), p. 1685-1690.
53. Kipar, A., et al., Histopathological alterations of lymphatic tissues in cats without feline infectious peritonitis after long-term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol*, 1999. 69(1-2): p. 131-137.
54. Kipar, A., et al., A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *J Comp Pathol*, 2001. 125(2-3): p. 182-191.

55. Paltrinieri, S., et al., Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 96(3-4): p. 141-148.
56. Takano, T., et al., B-cell activation in cats with feline infectious peritonitis (FIP) by FIP-virus-induced B-cell differentiation/survival factors. *Arch Virol*, 2009. 154(1): p. 27-35.
57. Foley, J.E., C. Rand, and C. Leutenegger, Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg*, 2003. 5(6): p. 313-322.
58. Hannen, M., et al., Cytokine-mediated regulation of granulocyte colony-stimulating factor production. *Scand J Immunol*, 1999. 50(5): p. 461-468.
59. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
60. Dean, G.A., et al., In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol*, 2003. 97(1-2): p. 1-12.
61. Boehm, U., et al., Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 749-795.
62. Kiss, I., A.M. Poland, and N.C. Pedersen, Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *J Feline Med Surg*, 2004. 6(2): p. 89-97.

63. Gelain, M.E, M. Meli, and S. Paltrinieri, Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *J feline Med Surg*, 2006. 8(6): p. 389-399.
64. Giordano, A. and S. Paltrinieri, Interferon-gamma in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. *Vet J*, 2009. 180(3): p. 396-398.
65. Van Deventer, S.J, et al., Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation fibrinolytic and complement pathways. *Blood*, 1990. 76(12): p. 2520-2526.
66. Ceron, J.J., P.D Eckersall, and S. Martinez-Subiela, Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*, 2005. 34(2): p. 85-99.
67. Paltrinieri, S., et al., Serum α 1-acidglycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *J Feline Med Surg*, 2007. 9(4): p. 271-277.
68. Cecilian, F., et al., Decreased sialylation of the acute phase protein α 1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Immunol Immunopathol*, 2004. 99(3-4): p. 229-236.
69. Duthie, S., et al., Value of alpha-1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec*, 1997. 141(12): p. 299-303.
70. Paltrinieri, S., et al., Association between faecal shedding of feline coronavirus and serum alpha1-acid glycoprotein sialylation. *J Feline Med Surg*, 2008. 10(5): p. 514-518.

CAPÍTULO 2

**Confrontando a teoria da mutação do *Feline coronavirus*
(FCoV): estudo filogeográfico e dissociação da diversidade genética
do gene 7b com a patogênese viral.**

2.1 Introdução

O *Feline coronavirus* (FCoV), pertencente a família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales* (de Vries et al., 1997), é um importante patógeno dos felinos domésticos e selvagens (Pedersen, 2009). Os FCoVs podem causar infecção subclínica, enterite leve (Pedersen et al., 1981) ou levar a peritonite infecciosa felina (PIF), uma doença fatal caracterizada por lesões inflamatórias sistêmicas das membranas serosas e lesões piogranulomatosas de órgãos parenquimatosos como fígado, baço, rim e cérebro (Pedersen, 1987, 2009).

Apesar da alta prevalência do FCoV na população felina (Bell et al., 2006; Kiss et al., 2000), apenas 5-10% dos gatos positivos desenvolvem a PIF (Addie and Jarrett, 1992; Addie et al., 1995). No Brasil, um recente estudo mostrou uma alta soroprevalência para o FCoV (75,2%) na região de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) (Johann et al., 2009).

Os determinantes genéticos, para o desenvolvimento da PIF, ainda não foram elucidados (Brown et al., 2009; Pedersen, 2009) e acredita-se, que a resposta imune do hospedeiro desempenhe papel fundamental na patogênese. Evidências, como diminuição extrema de células T de tecidos linfáticos e mudanças na expressão de citocinas no estágio final da PIF, sugerem que o sistema imune do animal desempenha um papel crucial na patogênese desta manifestação clínica (Kipar et al., 2006b).

A hipótese mais aceita na literatura para a patogênese da PIF, denominada teoria da mutação interna, afirma que durante a replicação do FCoV no epitélio intestinal ocorre uma mutação que torna o vírus mais patogênico, sendo capaz de

infectar monócitos e macrófagos e causar a PIF (Rottier et al., 2005; Vennema et al., 1998). Essa variante mutante virulenta foi denominada *Feline infectious peritonitis virus* (FIPV), enquanto a variante que leva a infecção entérica foi denominada *Feline enteric coronavirus* (FECV) (Pedersen et al., 1981; Poland et al., 1996). A natureza precisa da mutação responsável pela patogênese, ainda não foi identificada nos 29 Kb do genoma do FCoV (Dye and Siddell, 2007), embora estudos sugiram que mutações e, ou deleções nos genes para a proteína estrutural S (gene S) (Rottier et al., 2005) e para as proteínas não estruturais 7b (Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998) e 3c (Chang et al., 2010; Pedersen et al., 2009) (genes 7b e 3c, respectivamente), sejam determinantes para o desenvolvimento da PIF.

O gene 7b está localizado na extremidade 3' do genoma do FCoV e codifica a glicoproteína não estrutural 7b (gp7b) de 26,5 kilodaltons (KDa). A função precisa dessa glicoproteína na replicação do FCoV, ainda não é clara (Pedersen, 2009; Vennema et al., 1992). Tem sido especulado que a gp7b desempenha papel fundamental na virulência, uma vez que a maioria das amostras entéricas possui essa proteína truncada (Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998). Entretanto, um recente estudo mostrou que deleções no gene 7b ocorrem não somente nas amostras entéricas de baixa virulência, mas também em amostras obtidas de gatos com PIF (Lin et al., 2009b).

Um estudo recente, baseado na análise filogenética dos genes S, M, 3a-c e 7b de animais naturalmente infectados com o FCoV com sintomatologia clínica de PIF e assintomáticos, sugeriu ainda uma hipótese alternativa à teoria da mutação baseada na presença de duas variantes distintas de FCoV circulantes (Brown et al., 2009).

Nesse estudo, observou-se a presença de grupos monofiléticos agrupando as sequências de FECV (amostras obtidas de animais assintomáticos) e FIPV (amostras obtidas de animais sintomáticos) nas análises filogenéticas, sugerindo a existência de duas variantes distintas de FCoV circulantes. Além disso, esses autores concluíram que o gene 7b possui forte sinal filogenético para essa diferenciação (Brown et al., 2009).

Neste trabalho, o gene 7b de isolados virais brasileiros de FCoV de gatos assintomáticos e sintomáticos foram sequenciados em um estudo epidemiológico, e a correlação entre a diversidade genética desse gene e a diferenciação dos dois biotipos (FIPV e FECV) foi testada por meio de abordagens filogeográficas.

2.2 Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Infectologia Molecular Animal – LIMA, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa – UFV.

2.2.1 Animais e coleta das amostras

Neste estudo, foram incluídos 210 gatos domésticos (*Felis catus*) de diversas raças, selecionados aleatoriamente, atendidos em diversas clínicas veterinárias de Belo Horizonte e da Região Metropolitana de Belo Horizonte - MG (Tabela 2.1), no período de Março de 2003 a Outubro de 2010. As amostras de 2003 a 2008 foram gentilmente cedidas pelo Professor Maurício Resende, do Laboratório de Virologia

Comparada (LVC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 2.1. Distribuição do número de amostras de sangue total dos gatos domésticos de acordo com os locais onde foram coletadas.

Região	Número de amostras
Belo Horizonte	189
Betim*	2
Contagem*	13
Nova Lima*	6
Total	210

* Região Metropolitana de Belo Horizonte.

Dos 210 animais 129 eram saudáveis e foram levados às clínicas veterinárias para vacinação e cirurgias eletivas como ovariectomia e orquiectomia e 81 apresentavam alguma sintomatologia clínica de PIF como anorexia, perda de peso, icterícia, febre recorrente, irite, sinais neurológicos e efusão abdominal e, ou, torácica (Lin et al., 2009b; Pedersen, 2009). O exame clínico, a coleta do sangue total e o preenchimento de um formulário individual (também cedido pelo Professor Maurício Resende) discriminando o perfil do felino como sexo, idade, raça, higidez, número de outros felinos compartilhando o mesmo local e sinais clínicos, quando presentes, foram realizados pelos médicos veterinários de cada clínica.

A coleta do sangue foi feita por punção das veias cefálica, jugular, femoral ou safena, com auxílio de agulhas hipodérmicas (25X07) estéreis e seringas plásticas descartáveis. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi utilizado como anticoagulante (Gunn-Moore et al., 1998). As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos para obtenção do plasma e estocadas a -20°C até o momento da extração do RNA. A coleta das amostras seguiu as normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV e o projeto foi aprovado por esse mesmo comitê (Registro nº34/2010).

As amostras positivas foram identificadas de acordo com o número do formulário individual precedido pela sigla FCoV. Além disso, foi incluído na identificação o estado de saúde do animal (D-doente ou S-saudável), o ano da coleta e a sigla MG. Como a diferenciação do FCoV nos seus biotipos, FIPV e FECV, ainda não é bem definida, evitou-se a utilização desses termos na classificação das amostras.

2.2.2. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de 250 µL do plasma obtido conforme descrito no item 2.2.1 utilizando-se Trizol LS (Invitrogen - BR) segundo as instruções do fabricante. Os sedimentos de RNA obtidos foram solubilizados em 20 µL de água ultra pura estéril e estocados no freezer à - 80°C.

2.2.3 Oligonucleotídeos iniciadores (OI)

O gene para a proteína não estrutural 7b, localizado na extremidade 3' do genoma do FCoV (Figura 2.1), foi o alvo para os ensaios de reação em cadeia pela polimerase (PCR) *semi-nested* devido a associação proposta desta região com a virulência (Brown et al., 2009; Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998).

Para produção do cDNA foram utilizados 50 pmol do primer Oligo(DT) (Invitrogen) e para a amplificação do gene 7b, foram utilizados 20 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores externos e internos (Tabela 2.2) (Lin et al., 2009a).

Tabela 2.2. Oligonucleotídeos iniciadores externos e internos usados para amplificação completa do gene 7b.

Nome	Sequência (5'→3')	Sentido	Fragmento amplificado
7AF1	CTGCGAGTGATCTTTCTAG	+	914 pb
Externos			
P211	CACTAGATCCAGACGTTAGCTC	-	
7AF1	CTGCGAGTGATCTTTCTAG	+	766 pb
Internos			
UR1	ACCATTCTGTACAAGAGTAG	-	

+ : senso; - : antisenso; pb: pares de base (Lin et al., 2009a)

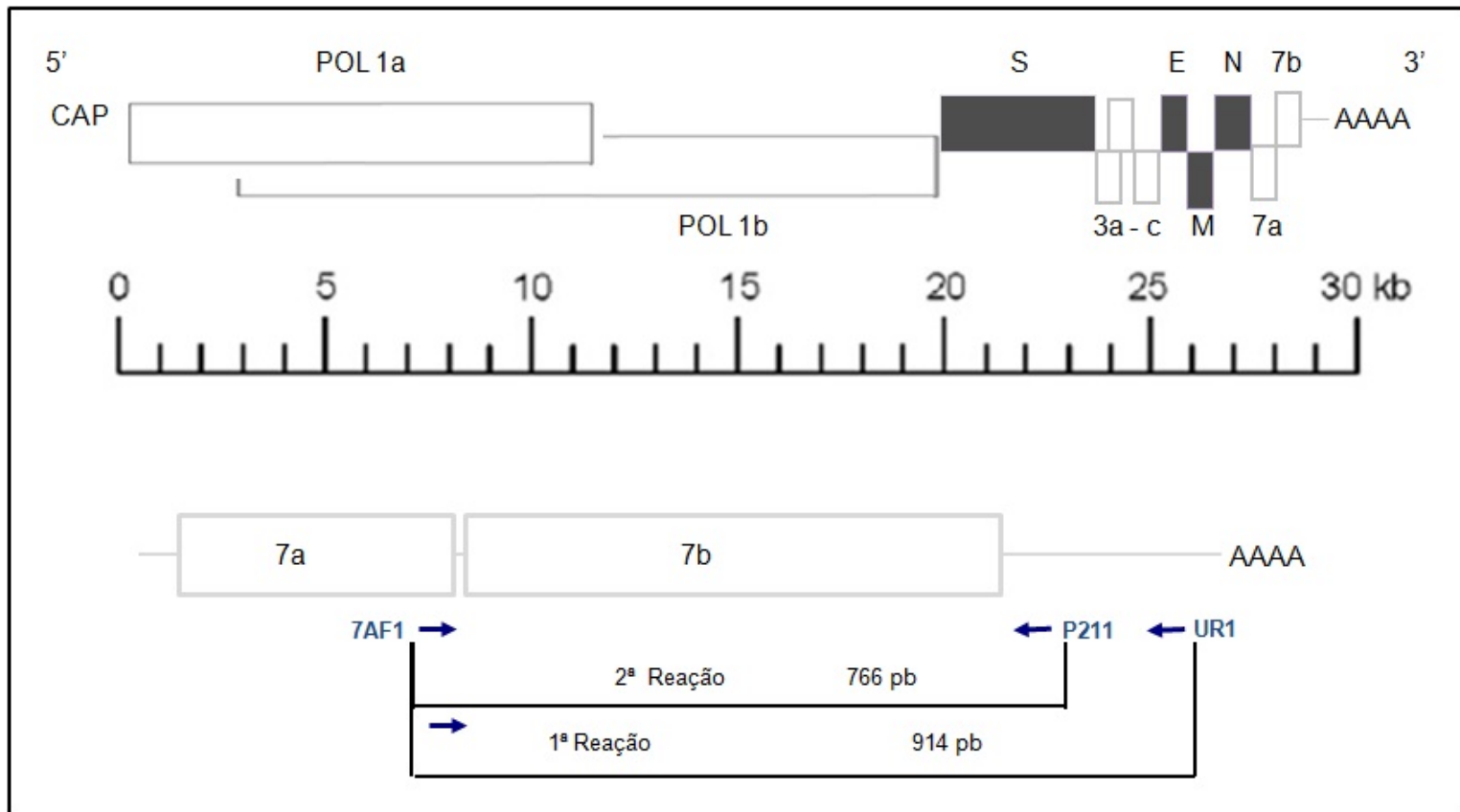


Figura 2.1. Representação esquemática da posição dos oligonucleotídeos iniciadores externos e internos em relação ao gene 7b do genoma do FCoV. Na parte superior da figura, o genoma completo do FCoV está representado esquematicamente com uma escala em Kb (Herrewegh et al., 1995). Na parte inferior, a região específica do genoma do FCoV amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores 7AF1, P211 e UR1 está representada em maior tamanho (Lin et al., 2009a).

2.2.4 Síntese do cDNA – transcrição reversa (RT)

Para a síntese do cDNA, as amostras de RNA total foram submetidas à ensaios de transcrição reversa utilizando o Kit *SuperScript III[®] First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen - BR). Uma mistura com 1 µL de RNA, 1 µL do primer Oligo(DT) (50 pmol) e 1 µL de dNTP mix (10 mM) para um volume final 13 µL foi aquecida a 65°C por 5 minutos em um termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) e, em seguida, colocados no gelo por um minuto. A essa mistura foram adicionados 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL do tampão RT-PCR Superscript[™] III 10 X (200 mM de Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de (RNaseOUT [40U/ µL]) e 0,5 µL da enzima transcriptase reversa Superscript[™] III (200 U/µL). Essa mistura foi aquecida a 54°C por 50 minutos e a 85°C por 5 minutos em um termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) e em seguida os cDNAs obtidos foram mantidos no freezer a -20 °C para posterior utilização nos ensaios de *semi-nested* PCR.

2.2.5 Semi-nested PCR para amplificação do gene 7b

2.2.5.1 Primeira reação (OI externos) e Segunda reação (OI internos)

Para a primeira reação de amplificação utilizou-se uma mistura com 2 µL do cDNA sintetizado, 1 µL dos OI externos específicos (20 pmol) e 10 µL do mix *GoTaq Green Master* (PROMEGA) (*Taq* DNA polimerase, tampão de reação pH 8, corantes azul e amarelo, 400 µM de dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 400 µM dGTP, 3mM MgCl₂) para um volume final de 20 µL. Para a segunda reação, utilizou-se 1 µL da primeira reação, 1 µL dos OI internos específicos (20 pmol) e 10

μL do mix *GoTaq Green Master* (PROMEGA) para um volume final de 20 μL . Tanto a primeira quanto a segunda reação foram processadas em termociclador (MJ RESEARCH, INC – PTC 100) com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por três minutos seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado o clone pBRDI1 (nº acesso no *Genbank*: AY204704) gentilmente cedido pelo Professor Maurício Resende. Além do controle positivo, foi feito um controle negativo dos reagentes, sem a inclusão de uma amostra de cDNA.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (SIGMA) 1,0% utilizando o padrão molecular *GeneRuler* 1 Kb (FERMENTAS) e corado com brometo de etídio na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (SIGMA). O produto amplificado foi visualizado em luz ultravioleta (Vilber Loumart TFX-20 M Power 180W).

2.2.6. *Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento genético*

Os produtos amplificados foram enviados a Macrogen Inc (Coréia do Sul) onde foram purificados e sequenciados pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977), em sequenciador automático capilar.

2.2.7 *Análise das sequências do gene 7b*

2.2.7.1 *Montagem dos contigs do gene 7b*

A montagem dos *contigs* das sequências dos isolados virais do FCoV foi realizada utilizando os programas Phred (Ewing and Green, 1998) e Phrap (<http://www.phrap.org>), que montam os *contigs* a partir dos dados de cromatograma gerados nas reações de sequenciamento. Após a montagem, somente as amostras cujas bases sequenciadas apresentaram uma acurácia maior do que 99% (valor do parâmetro Phred Qual > 20) foram selecionadas, conforme o recomendado pela literatura (Ewing and Green, 1998).

2.2.7.2 *Busca de sequências em banco de dados*

Para realizar o estudo filogeográfico e diferenciar os dois biotipos do FCoV, foram selecionadas as sequências completas do gene 7b, incluindo as amostras clássicas do FCoV (Tabela 2.3), disponíveis no banco de dados *Nucleotide* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). A nomenclatura original dessas sequências foi mantida. Em seguida, as sequências obtidas foram reunidas com as sequências dos isolados brasileiros em um mesmo conjunto de dados e alinhadas no programa ClustalW (Thompson et al., 1994), utilizando as configurações padrão para o alinhamento e inserção de *gaps*.

Tabela 2.3. Sequências completas do gene 7b do genoma do FCoV selecionadas no NCBI com seus respectivos países de origem e ano de isolamento.

Código de acesso	Nomenclatura	País de origem	Ano do isolamento
DQ648122	FCoV NTU1P	Taiwan	2002
DQ675414	FCoV NTU3A	Taiwan	2003
DQ675415	FCoV NTU4P	Taiwan	2003
DQ675416	FCoV NTU5A	Taiwan	2003
DQ675420	FCoV NTU9R	Taiwan	2004
DQ675424	FCoV NTU13R	Taiwan	2004
DQ675425	FCoV NTU14R	Taiwan	2004
DQ675426	FCoV NTU15R	Taiwan	2004
DQ675427	FCoV NTU16R	Taiwan	2004
DQ675435	FCoV NTU25R	Taiwan	2004
DQ675446	FCoV NTU37A	Taiwan	2005
DQ848678	FIPV C1Je	UK	2006
X90571	FIPV Wellcome	UK	1979
EU186072	FIPV Black	USA	1970
FJ917519	FIPV-UCD11a	USA	2008
FJ917520	FIPV UCD11b	USA	2008
FJ917521	FIPV UCD12	USA	2008
FJ917522	FECV UCD5	USA	2008
FJ917523	FIPV UCD13	USA	2008
FJ917524	FIPV UCD14	USA	2007
FJ917525	FIPV UCD15a	USA	2008
FJ917526	FIPV UCD16	USA	2008
FJ917527	FIPV UCD17	USA	2008
FJ917528	FIPV UCD18a	USA	2008
FJ938051	FECV RM	USA	1995
FJ943772	FECV UCD6-1	USA	2008
NC_002306	FIPV WSU 79-1146	USA	1979
X90573	FIPV NOR15	USA	1981
X90574	FECV UCD	USA	1981
X90575	FIPV UCD1	USA	1981
X90577	FIPV UCD3	USA	1985
X90578	FIPV UCD4	USA	1985

2.2.7.3 Análises filogenéticas

Os agrupamentos filogenéticos foram estabelecidos a partir de hipóteses filogenéticas inferidas por inferência bayesiana, utilizando o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

Para agilizar a construção das árvores filogenéticas, um modelo básico de substituição de nucleotídeos foi estimado com o auxílio do programa MrModeltest (Nylander et al., 2004). Esse programa, forneceu ao programa MrBayes v.3.1 os parâmetros a serem estimados, evitando assim, excesso de parâmetros a serem utilizados na estimativa das topologias e tamanhos de ramos.

As árvores filogenéticas foram calculadas no MrBayes pelo método de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 50.000.000 de gerações, em quatro cadeias e quatro corridas independentes. Foram descartadas (*burning*) 25% das árvores amostradas para gerar a árvore consenso. A árvore consenso gerada foi visualizada e editada usando o programa FigTree Version 1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

2.2.7.4 Agrupamento das sequências em haplótipos

Com o objetivo de estabelecer as relações genealógicas dos dois biotipos do FCoV (FIPV e FECV) descritos na literatura, o conjunto de sequências geradas e selecionadas no banco de dados descritas no item 2.2.7.2 foram agrupadas em haplótipos (grupos de sequências com 100% de identidade). Para isso, utilizou-se o programa SNAP Workbench version 2.0 (Aylor et al., 2006; Price and Carbone, 2005). Os *gaps* e as violações do modelo de sítios infinitos, posições com múltiplas

mutações (Kimura, 1969), foram removidas do grupo de sequências para diminuir os sítios com muitas variações.

Para representar a distribuição geográfica e as relações genealógicas entre os haplótipos do FCoV, uma rede de haplótipos foi calculada no programa Network 4.5.1.6 (<http://www.fluxus-technology.com>) a partir do algoritmo de *Median Joining* (MJ) (Bandelt et al., 1999), utilizando as configurações padrões do programa.

2.2.8 *Análise estatística*

Com o objetivo de aumentar as informações epidemiológicas das primeiras sequências brasileiras, foi avaliado se as características dos gatos domésticos, como a raça, a idade, o sexo, as evidências clínicas (animais saudáveis e doentes) e a quantidade de gatos domésticos vivendo em um mesmo local exerciam efeito na presença do FCoV no grupo de animais positivos e negativos incluídos nesse estudo.

Para a comparação das características citadas acima no grupo de animais positivos e negativos utilizou-se o teste do Qui-quadrado com a correção de Yates (Sokal and Rohlf, 1981). Todas as interpretações foram feitas considerando o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram desenvolvidas no software R, versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010).

2.3 Resultados

2.3.1 Ocorrência do FCoV na população estudada

Dos 210 animais analisados neste estudo, 106 (50,5%) foram positivos para o gene 7b do FCoV na *semi-nested* PCR. As reações de *semi-nested* PCR amplificaram um fragmento de 766pb na segunda reação (Figura 2.2) conforme o esperado.

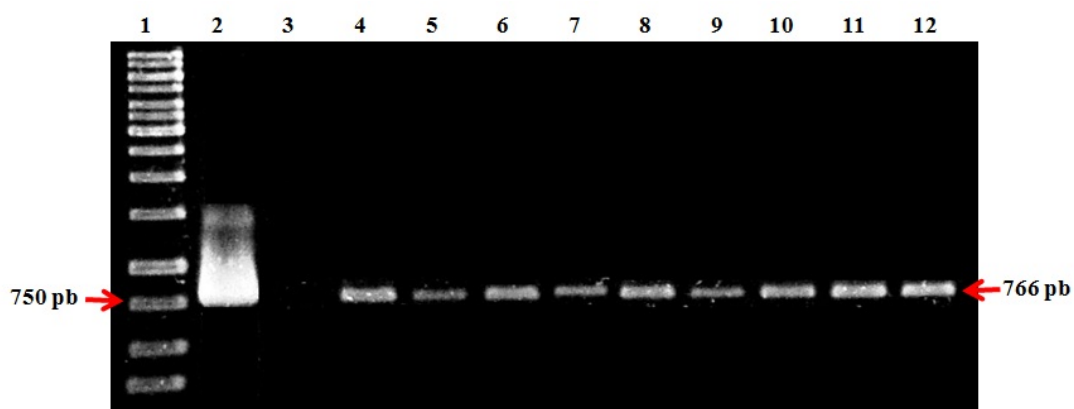


Figura 2.2. Amplificação do gene 7b do FCoV obtidos de amostras de plasma de gatos domésticos. Linha 1: Padrão de peso molecular (*GeneRuler* 1 Kb – FERMENTAS). Linha 2: Controle positivo (clone pBRDI1). Linha 3: Controle negativo. Linhas 4 a 12: Produtos da segunda reação da *semi-nested* PCR do plasma dos gatos domésticos.

Baseado na sintomatologia clínica, os gatos positivos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo reuniu 63 gatos saudáveis (59,4%), que foram classificados como S (saudáveis) e o segundo, classificado como D (doente), reuniu 43 gatos (40,6%) com algum sinal clínico sugestivo de PIF. Os sinais clínicos predominantes foram anorexia (65,1%), febre (18,6%), icterícia (14,0%), irite e sinais neurológicos (11,6%) e efusão abdominal e, ou, torácica (11,6%) (Figura 2.3).

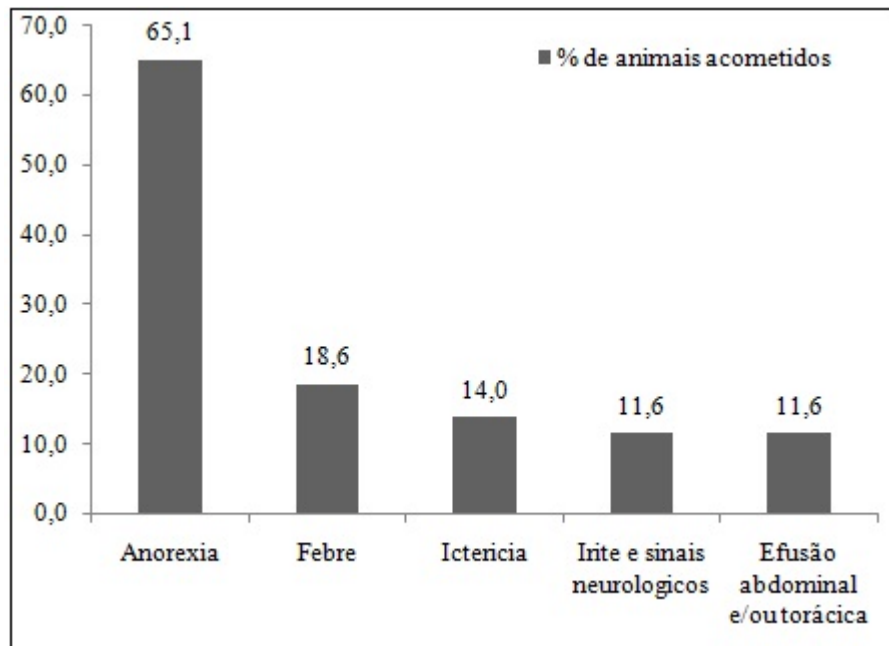


Figura 2.3. Principais sinais clínicos observados no grupo de animais com algum sinal clínico sugestivo de PIF (grupo D).

Sobre a presença do FCoV no grupo de animais positivos e negativos (Tabela 2.4), não houve diferença significativa nas comparações das características dos gatos domésticos, quanto ao sexo ($\chi^2 = 0,93$; $p\text{-value} = 0,334$; grau de liberdade (gl) = 1); a raça ($\chi^2 = 0,18$; $p\text{-value} = 0,669$; gl = 1); a idade ($\chi^2 = 2,37$; $p\text{-value} = 0,497$; gl = 3); as evidências clínicas (animais saudáveis e doentes) ($\chi^2 = 0,20$; $p\text{-value} = 0,647$; gl = 1) e a quantidade de gatos domésticos vivendo em um mesmo local ($\chi^2 = 2,65$; $p\text{-value} = 0,616$; gl = 4).

Tabela 2.4. Caracterização da população de gatos domésticos estudada.

Variável	Número de animais †		P value‡
	Positivos (%)	Negativos (%)	
Sexo			
Macho	49/106 (46,2%)	56/104 (53,8%)	0,334
Fêmea	57/106 (53,8%)	48/104 (46,2%)	
Raça			
Raça	25/106 (23,6%)	21/104 (20,2%)	0,669
Sem raça definida	81/106 (76,4%)	83/104 (79,8%)	
Idade			
Menos que 1 ano	4/106 (3,8%)	8/104 (7,7%)	0,497
1-3 anos	69/106 (65,1%)	67/104 (64,4%)	
4-9 anos	27/106 (25,4%)	21/104 (20,2%)	
Mais de 10 anos	6/106 (5,7%)	8/104 (7,7%)	
Higidez			
Doente	43/106 (40,6%)	38/104 (36,5%)	0,647
Saudável	63/106 (59,4%)	66/104 (63,5%)	
Número gatos no ambiente			
1	23/106 (21,7%)	21/104 (20,2%)	0,616
2 a 9	33/106 (31,1%)	24/104 (23,1%)	
10 a 19	9/106 (8,5%)	12/104 (11,5%)	
20 a 30	8/106 (7,6%)	7/104 (6,7%)	
>30	33/106 (31,1%)	40/104 (38,5%)	

†: número (n°) de gatos positivos ou negativos/n° de gatos testados por *semi-nested* PCR.

‡: teste do Qui-quadrado com a correção de Yates.

2.3.2 Análise filogenética e filogeográfica

Foram obtidas 51 sequências completas (621 pb) do gene 7b das amostras virais do FCoV (Tabela 2.5). Dentre essas, 24 foram obtidas de gatos provenientes do mesmo gatil conforme indicado na tabela 2.5.

A análise nucleotídica das sequências estudadas revelou que o gene 7b é muito conservado. Apenas quatro sequências se diferenciaram das demais pela presença de polimorfismos em seis posições na sequência de nucleotídeos do gene 7b (Figura 2.3a, Tabela 2.5). As 51 sequências foram reunidas em cinco haplótipos e o haplótipo Hap5 foi o mais frequente (Tabela 2.5). Apesar dos polimorfismos resultarem em mudanças de aminoácidos na sequência da proteína, nenhum polimorfismo específico relacionado à diferenciação entre animais doentes e sadios foi identificado.

Tabela 2.5. Descrição das sequências do gene 7b do FCoV obtidas das amostras brasileiras.

Nomenclatura	Higidez	Ano da coleta	Haplótipo/Frequência
FCoV 282	Doente	2003	Hap5/47
FCoV 310	Saudável	2003	Hap5/47
FCoV 449	Doente	2003	Hap5/47
FCoV 579	Saudável	2003	Hap5/47
FCoV 781	Saudável	2004	Hap5/47
FCoV 798	Doente	2004	Hap5/47
FCoV 832	Doente	2004	Hap5/47
FCoV 876	Doente	2004	Hap5/47
FCoV 955	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1012*	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1025*	Saudável	2005	Hap5/47

FCoV 1033*	Doente	2005	Hap5/47
FCoV 1039*	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1043	Doente	2005	Hap5/47
FCoV 1052•	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1055•	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1058•	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1080	Saudável	2005	Hap5/47
FCoV 1102	Doente	2005	Hap5/47
FCoV 1106	Doente	2005	Hap5/47
FCoV 1107	Doente	2005	Hap5/47
FCoV 1306	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1316	Doente	2007	Hap5/47
FCoV 1326	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1327	Doente	2007	Hap4/1
FCoV 1329	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1332	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1341	Saudável	2007	Hap1/1
FCoV 1354♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1355♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1364♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1366♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1367♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1371♦	Doente	2007	Hap5/47
FCoV 1373♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1378♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1381♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1383♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1386♦	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1406♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1414♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1415♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1421♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1427♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1439♣	Saudável	2007	Hap5/47
FCoV 1462	Saudável	2008	Hap2/1
FCoV 1464	Saudável	2008	Hap5/47
FCoV 1465	Doente	2008	Hap5/47
FCoV 1468	Doente	2010	Hap5/47
FCoV 1469	Doente	2010	Hap5/47
FCoV 1476	Doente	2010	Hap3/1

*, ●, ◆ e ♣ indicam grupo de gatos provenientes de um mesmo gatil.

Na rede obtida, os haplótipos foram identificados conforme a sintomatologia clínica dos animais (Figura 2.3b) com o objetivo de determinar a relação entre os polimorfismos das sequências do FCoV e a patogênese da PIF. A maioria dos animais sintomáticos e assintomáticos foi incluída no haplótipo Hap5 e os demais haplótipos, tanto virulentos como avirulentos, descendem desse haplótipo, não havendo, portanto, relação do fenótipo da doença PIF com polimorfismos (ou mutações) no gene 7b do FCoV.

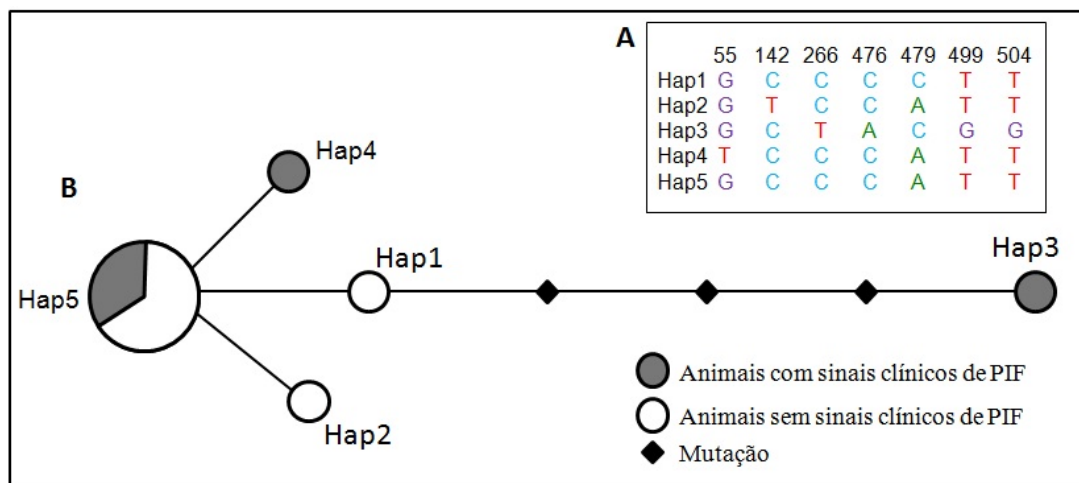


Figura 2.4. Rede de haplótipos e polimorfismo das amostras brasileiras do FCoV. (A) Polimorfismos dos haplótipos e suas posições no gene 7b. (B) Rede de haplótipos construída com o algoritmo MJ utilizando o programa Network 4.5.1.0. O tamanho da circunferência e dos braços da rede é proporcional a frequência dos haplótipos e ao número de mutações, respectivamente.

Para verificar se as mesmas relações descritas para os isolados brasileiros de FCoV também são observadas para isolados originários de outras regiões

geográficas, um novo conjunto de dados com 83 sequências foi organizado. Nesse conjunto de dados, estão reunidas as 51 sequências do gene 7b obtidas neste trabalho e outras 32 sequências disponíveis no banco de dados *Nucleotide* do *GenBank*.

Essas sequências foram, então, reagrupadas em 28 haplótipos (Tabela 2.6), considerando o modelo de sítios infinitos da evolução dos genomas (Kimura, 1969).

Na rede de haplótipos obtida com esse conjunto de dados, os haplótipos foram identificados conforme a sintomatologia clínica (Figura 2.4a) e a origem geográfica do isolado viral (Figura 2.4b).

A rede de haplótipos mostra que o agrupamento desses 28 haplótipos conforme a sintomatologia clínica (Figura 2.4a) apresentou o mesmo padrão observado na análise dos isolados brasileiros do FCoV (Figura 2.3). Isolados virais de animais com sinais clínicos de PIF e isolados de animais sadios foram agrupados nos mesmos haplótipos. Além disso, também não foi possível estabelecer uma relação ancestral/descendente que distinguisse esses isolados virais de acordo com o sinal clínico.

De acordo com a teoria da mutação, seria esperado que, na rede de haplótipos (Figura 2.4a), os isolados virais de animais sadios fossem os ancestrais dos isolados virais de animais com PIF. Entretanto, essa relação somente foi observada para os haplótipos H18 e H19 (Figura 2.4a). O haplótipo H18 corresponde a uma variante clássica de FECV isolada em 1981 nos EUA e está separado por uma mutação do H19.

Além disso, a rede de haplótipos identificada conforme a origem geográfica (Figura 2.4b) mostra que os haplótipos foram agrupados de acordo com as regiões

geográficas, sugerindo que cada grupo de isolado viral é originário de uma linhagem que dará origem a novas variantes virais.

O agrupamento dos isolados virais de acordo com a origem geográfica, por outro lado, possibilitou a separação dos haplótipos (Figura 2.4b). Entre os haplótipos, o H28 foi o único que agrupou isolados virais originários de países diferentes, sendo identificado no Brasil e nos Estados Unidos.

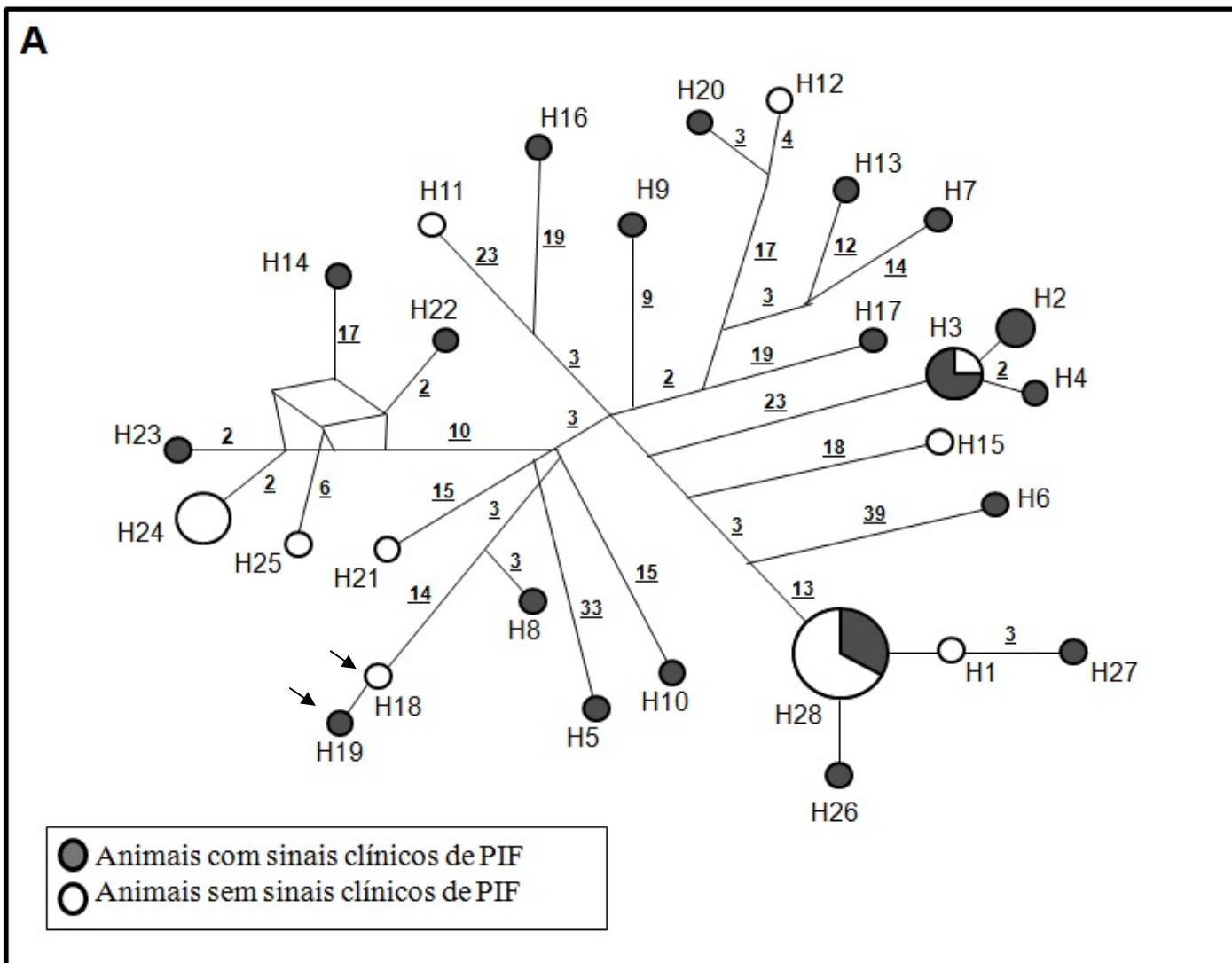
A separação dos haplótipos de acordo com a sua origem geográfica mostra que os fatores determinantes da diferenciação entre os isolados virais de FCoV são os múltiplos eventos de introdução das linhagens virais nas diferentes regiões geográficas (Figura 2.4b) e não a relação desses isolados com a patogenicidade da PIF (Figura 2.4a).

Não foi possível definir na rede de haplótipos (Figura 2.4), um único ancestral que deu origem aos demais isolados virais. Entretanto, o haplótipo H28 fornece informações sobre a introdução dos isolados de FCoV no Brasil. Nesse haplótipo, está incluída a variante clássica FIPV WSU 79-1146, isolada em 1979 nos EUA, o que sugere que o vírus foi introduzido no Brasil a partir dos Estados Unidos.

A árvore filogenética (Figura 2.5) apresentou os mesmos padrões de agrupamento das redes de haplótipos (Figuras 2.4a e 2.4b). Os isolados virais foram agrupados conforme a sua origem geográfica e não foram observados grupos monofiléticos que distinguíssem os isolados de acordo com a patogenicidade.

Tabela 2.6. Haplótipos formados a partir de sequências completas do gene 7b de diferentes regiões geográficas.

Haplótipo	Frequência	Isolado
H1	1	FCoV/1341/S/2007/MG
H2	2	FIPV UCD11a USA
H2	2	FIPV UCD11b USA
H3	3	FIPV UCD12 USA
H3	3	FECV UCD5 USA
H3	3	FIPV UCD13 USA
H4	1	FIPV UCD14 USA
H5	1	FIPV UCD4 USA
H6	1	FIPV Wellcome UK
H7	1	FIPV UCD15 USA
H8	1	FIPV UCD1 USA
H9	1	FIPV UCD17 USA
H10	1	FCoV NTU37 Taiwan
H11	1	FECV RM USA
H12	1	FECV UCD6-1 USA
H13	1	FIPV Black USA
H14	1	FCoV NTU1P Taiwan
H15	1	FCoV NTU9R Taiwan
H16	1	FIPV C1Je UK
H17	1	FIPV UCD18 USA
H18	1	FECV UCD USA
H19	1	FIPV UCD3 USA
H20	1	FIPV UCD16 USA
H21	1	FCoV NTU3A Taiwan
H22	1	FCoV NTU4P Taiwan
H23	1	FCoV NTU5A Taiwan
H24	4	FCoV NTU13 Taiwan
H24	4	FCoV NTU14 Taiwan
H24	4	FCoV NTU15 Taiwan
H24	4	FCoV NTU16 Taiwan
H25	1	FCoV NTU25 Taiwan
H26	1	FIPV NOR15 USA
H27	1	FCoV/1476/D/2010/MG
H28	50	Todas as sequências brasileiras, exceto as incluídas no H1 e H27
H28	50	FIPV WSU79 USA



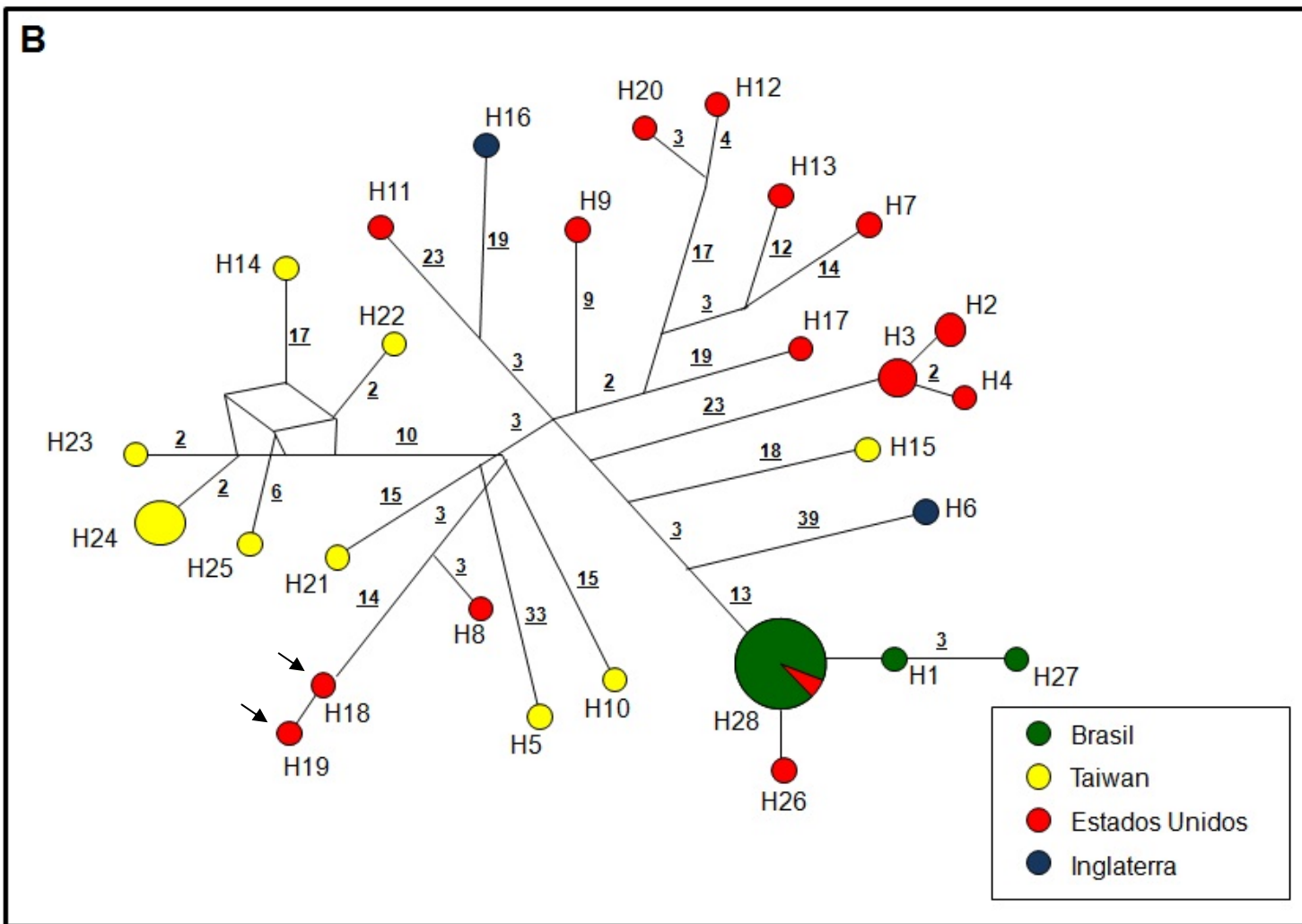


Figura 2.5. Rede de haplótipos do FCoV. Rede de haplótipos construída com o algoritmo MJ utilizando o programa Network 4.5.1.0. O tamanho da circunferência é proporcional a frequência dos haplótipos. O tamanho dos braços da rede foi alterado para melhor representação. O número de mutações de cada braço está representado por números sublinhados. Ausência de números indica que houve uma única mutação. As setas identificam os haplótipos H18 e H19. (A) Haplótipos identificados conforme a sintomatologia clínica. (B) Haplótipos identificados conforme a origem geográfica.

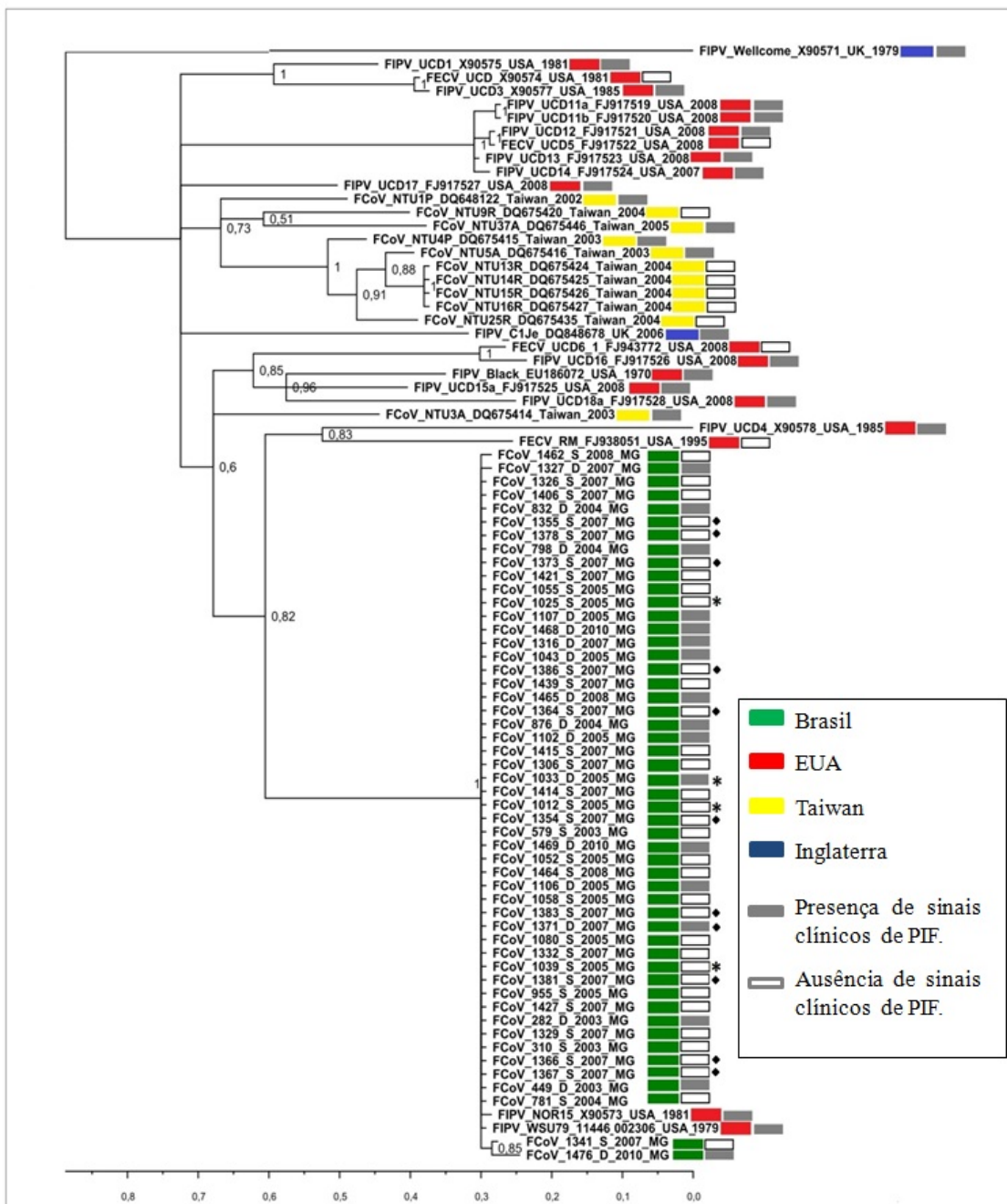


Figura 2.6. Classificação filogenética do FCoV com base no gene 7b. Árvore filogenética consenso das 83 sequências completas do gene 7b obtida por Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade posteriores calculados pelo programa MrBayes estão indicados ao lado de cada nó. Os ramos da árvore filogenética foram agrupados de acordo com a localização geográfica de cada sequência. As cores dos retângulos correspondem a origem geográfica e a presença ou ausência de sinais clínicos de PIF. Os símbolos * e ♦ indicam gatos de um mesmo gatil.

2.4 Discussão

Neste trabalho, os resultados das análises filogeográficas das sequências do gene 7b de isolados brasileiros de FCoV lançam novas perspectivas sobre a patogênese da PIF e a sua relação com os polimorfismos desse gene.

O gene 7b se mostrou altamente conservado entre os 51 isolados virais brasileiros, 47 isolados apresentaram sequências idênticas, diferentemente do que tem sido descrito em outros trabalhos (Brown et al., 2009; Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998).

De acordo com a literatura, a ocorrência de deleções no gene 7b contribuía para a perda da virulência e estão associadas a cepas de FCoV isoladas de animais sem sinais clínicos de PIF (Herrewegh et al., 1995; Vennema et al., 1998). Entretanto, essas deleções também foram observadas nas sequências de isolados virais de animais com sintomatologia clínica de PIF, mostrando que essas deleções não estão correlacionadas com a baixa patogenicidade do FCoV (Lin et al., 2009a). Todos os isolados brasileiros de FCoV analisados possuem o gene 7b intacto, mostrando que a ocorrência de deleções nesse gene não está relacionada com a alteração da patogenicidade.

Além do efeito das deleções, a teoria da mutação afirma que isolados virais de animais assintomáticos, denominados como FECV, sofrem mutações e dão origem aos isolados virais de animais com sintomatologia de PIF, denominados como FIPV (Herrewegh et al., 1995; Pedersen, 2009; Vennema et al., 1998). Sendo assim, de acordo com essa teoria, seria esperado, nas redes de haplótipos (Figuras 2.3 e 2.4a) e na árvore filogenética, que os isolados de FCoV de animais assintomáticos fossem ancestrais dos isolados de animais com sintomatologia de PIF. Contradizendo essa

teoria, 15 isolados brasileiros de FCoV de animais com sinais clínicos de PIF e 32 isolados de animais assintomáticos apresentaram sequências idênticas do gene 7b e foram agrupados em um mesmo haplótipo (Figura 2.3 e Tabela 2.5), inclusive as sequências obtidas de animais saudáveis e doentes de um mesmo gatil (gatis identificados como * e ♦ na tabela 2.5). Essas sequências foram incluídas no mesmo haplótipo e mesmo clado da árvore filogenética, sem mostrar relação de ancestralidade.

A relação ancestral/descendente somente foi observada para os haplótipos H18 e H19 (Figura 2.4a). O haplótipo H18 corresponde a uma cepa clássica de FECV isolada em 1981 nos EUA e está separado por uma mutação do haplótipo H19.

Por outro lado, a separação dos haplótipos de acordo com a sua origem geográfica mostra que os fatores determinantes da diferenciação entre os isolados virais de FCoV são os múltiplos eventos de introdução das cepas virais nas diferentes regiões geográficas (Figura 2.4b) e não a relação desses isolados com a patogencidade da FIP (Figura 2.4a). Essa separação dos isolados virais conforme a sua origem geográfica também tem sido descrita na literatura (Lin et al., 2009b; Pedersen et al., 2009; Sharif et al., 2010).

A rede de haplótipos (Figura 2.4b) também mostra a introdução dos isolados brasileiros a partir dos Estados Unidos. Os isolados brasileiros foram agrupados com o isolado norte-americano FIPV WSU 79-1146. Além disso, na árvore filogenética (Figura 2.5), todas as sequências dos isolados brasileiros foram incluídas em um mesmo ramo da árvore, juntamente as variantes clássicas dos EUA FIPV WSU 79-1146 e FIPV NOR15, apoiando esse achado.

Um estudo filogenético com sequências parciais do gene 7b sugeriu a presença de duas cepas circulantes, que se diferenciam pela patogenicidade (Brown et al., 2009). Entretanto, na árvore filogenética (Figura 2.5), as sequências formaram grupos bem definidos e que se diferenciam de acordo com a região geográfica dos isolados virais. Além disso, não houve a formação de grupos monofiléticos que distinguíssem as sequências de FIPV e FECV, contradizendo a hipótese de duas cepas circulantes. Esta observação é sustentada pelos altos valores de probabilidade posterior dos agrupamentos.

A amostra *Wellcome* (UK) apresentou-se como a mais divergente evolutivamente, fato também observado em outro estudo (Herrewegh et al., 1995), o que indica alto grau de diversidade genética observada entre os FCoV (Vennema et al., 1998). Essa característica é esperada nos vírus com genoma de RNA, uma vez que eles são marcados por altas taxas de mutação durante sua evolução (Holmes, 2009).

Para o FCoV, já foi demonstrado que existem numerosas variantes definidas por polimorfismos de um único nucleotídeo e por polimorfismo de pequenas inserções e deleções, sem acarretar em forma mais ou menos grave da doença (Lin et al., 2009b; Pedersen, 2009). Nesse estudo, tanto sequências obtidas de animais saudáveis quanto obtidas de animais com sinais clínicos de PIF, apresentaram posições polimórficas corroborando esses resultados.

A hipótese da teoria da mutação com alteração do fenótipo da doença é bem explicada para outros vírus. Na infecção pelo HIV-1, por exemplo, uma mutação no gene para envelope do vírus altera o seu receptor levando a um maior tropismo pelos linfócitos CD4 e a uma redução drástica dessas células (Hartley et al., 2005). O vírus da

gastroenterite transmissível dos suínos (*Transmissible gastroenteritis vírus* - TGEV), pertencente ao mesmo gênero *Alphacoronavirus* do FCoV, sofreu mutação, espontaneamente na década de 80, dando origem ao *Porcine respiratory coronavirus* (PRCV). O PRCV possui deleções no gene S e mutações pontuais e/ou deleções no gene 3c (Laude et al., 1993). Entretanto, para o FCoV não existe uma mutação pontual em um único gene que seja consistentemente associada a transição do FECV para o FIPV (Chang et al., 2010; Dye and Siddell, 2007).

Foi possível detectar o FCoV no plasma de 63 (59,4%) animais saudáveis o que, provavelmente, indica viremia. O desenvolvimento de viremia independente do estado de saúde dos gatos já foi demonstrado e o significado para o desenvolvimento da PIF ainda é pouco entendido (Can-Sahna et al., 2007; Gunn-Moore et al., 1998; Kipar et al., 2006a).

A PIF ocorre em apenas uma pequena proporção de gatos soropositivos para o FCoV (Addie and Jarrett, 1992; Foley et al., 1997), apesar da alta prevalência desse vírus na população felina (Bell et al., 2006; Johann et al., 2009; Kiss et al., 2000). Nesse estudo, dos 106 animais positivos por *semi-nested* PCR 43 (40,6%) apresentavam algum sinal clínico de PIF. A incidência de sinais clínicos relacionados a forma efusiva da doença, com acúmulo de líquidos nas cavidades torácicas e abdominais, foi de apenas 11,6%. Outro estudo, que avaliou tecidos necropsiados de gatos com suspeita clínica de PIF mostrou que 61,53% dos casos se apresentavam na forma efusiva (Oliveira et al., 2003), o que indica que a forma não efusiva, com sinais inespecíficos de PIF, possa ser pouco diagnosticada. Irite e sinais neurológicos ocorreram em uma pequena proporção de animais sintomáticos (11,3%), fato já observado por outros autores (Oliveira et al., 2003).

De acordo com alguns estudos, a ocorrência do FCoV é maior em gatos de raça pura (Cave et al., 2004; Pesteanu-Somogyi et al., 2006), onde há a aglomeração de animais e entre os animais mais jovens (Cave et al., 2004; Foley et al., 1997; Kiss et al., 2000). Nesse estudo, entretanto, nenhuma associação com significado estatístico significativo foi observada (Tabela 2.4). Esse fato pode ser justificado pelo número de animais positivos e negativos ter variado pouco, independentemente de qual categoria considerada (sexo, raça, idade, higidez e número de gatos no mesmo ambiente). Assim, novos estudos são necessários para avaliar o efeito dessas categorias na presença do FCoV, considerando as amostras brasileiras.

2.5 Conclusão

As sequências brasileiras, bem como sequências previamente caracterizadas de outras regiões geográficas obtidas de animais sem e com sinais clínicos de PIF, não foram distinguidas pelas análises filogenética e filogeográfica do gene 7b, pondo em questionamento a teoria da mutação interna do FCoV. Como genes diferentes podem apresentar diferente dinâmica evolutiva, outras relações entre as sequências podem ser estabelecidas no estudo de outras regiões do genoma do FCoV, indicando a necessidade de mais estudos utilizando as mesmas metodologias descritas neste trabalho a fim de validar ou não essa teoria.

2.6 Referências bibliográficas

Addie, D.D., Jarrett, O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. **Veterinary Record**, v. 130, n. 7, p. 133-137, 1992.

Addie, D.D., Toth, S., Murray, G.D., Jarrett, O. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 429-434, 1995.

Aylor, D.L., Price, E.W., Carbone, I. SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. **Bioinformatics**, v. 22, n. 11, p. 1399-1401, 2006.

Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n.1, p. 37-48, 1999.

Bell, E.T., Toribio, J.A., White, J.D., Malik, R., Norris, J.M. Seroprevalence study of feline coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 3, p. 74-81, 2006.

Brown, M.A., Troyer, J.L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M.E., O'Brien, S.J. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. **Emerging Infectious Diseases** v. 15, n. 9, p. 1445-1452, 2009.

Can-Sahna, K., Soydal Ataseven, V., Pinar, D., Oguzoglu, T.C. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 5, p. 369-372, 2007.

Cave, T.A., Golder, M.C., Simpson, J., Addie, D.D. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 2, p. 53-58, 2004.

Chang, H.W., de Groot, R.J., Egberink, H.F., Rottier, P.J. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. **Journal of General Virology** v. 91, n. Pt2, p. 415-420, 2010.

de Vries, A.A.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., de Groot, R.J. The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. **Seminars in Virology**, v.8, n. 1, p. 33-47, 1997.

Dye, C., Siddell, S.G. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 3, p. 202-213, 2007.

Ewing, B., Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

Foley, J.E., Poland, A., Carlson, J., Pedersen, N.C. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 210, n. 9, p. 1313-1318, 1997.

Gunn-Moore, D.A., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 193-205, 1998.

Hartley, O., Klasse, P.J., Sattentau, Q.J., Moore, J.P. V3: HIV's switch-hitter. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 171-189, 2005.

Herrewegh, A.A., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., de Groot, R.J. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 622-631, 1995.

Holmes, E.C. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 353-372, 2009.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

Johann, J.M., Caetano, C.F., Hass, R., Guim, T.N., Fischer, G., Vargas, G.D., Vidor, T., Hübner, S.O. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 752-754, 2009.

Kimura, M. The rate of molecular evolution considered from the standpoint of population genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63, n. 4, p. 1181-1188, 1969.

Kipar, A., Baptiste, K., Barth, A., Reinacher, M. Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n.1, p. 69-72, 2006a.

Kipar, A., Meli, M.L., Failing, K., Euler, T., Gomes-Keller, M.A., Schwartz, D., Lutz, H., Reinacher, M. Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 141-155, 2006b.

Kiss, I., Kecskemeti, S., Tanyi, J., Klingeborn, B., Belak, S. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. **Veterinary Journal**, v. 159, n. 1, p. 64-70, 2000.

Laude, H., Van Reeth, K., Pensaert, M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 24, n. 2, p. 125-150, 1993.

Lin, C.N., Su, B.L., Huang, H.P., Lee, J.J., Hsieh, M.W., Chueh, L.L. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 6, p. 413-419, 2009a.

Lin, C.N., Su, B.L., Wang, C.H., Hsieh, M.W., Chueh, T.J., Chueh, L.L. Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 233-239, 2009b.

Nylander, J.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., Nieves-Aldrey, J.L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systems Biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004.

Oliveira, F.N., Raffi, M. B., Souza, T. M., Barros, C.S.L. Peritonite infecciosa felina: 13 casos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 905-911, 2003.

Pedersen, N.C. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 218, p. 529-550, 1987.

Pedersen, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 4, p. 225-258, 2009.

Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., Fudge, A., Barker, J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 3, p. 368-377, 1981.

Pedersen, N.C.L., H.; Dodd, K. A.; Pesavento, P. A. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. **Viruses**, v. 1, n. 2, p. 166-184, 2009.

Pesteanu-Somogyi, L.D., Radzai, C., Pressler, B.M. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2006.

Poland, A.M., Vennema, H., Foley, J.E., Pedersen, N.C. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. **Journal of Clinical Microbiology** v. 34, n. 12, p. 3180-3184, 1996.

Price, E.W., Carbone, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 402-404, 2005.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing - Reference Index. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://cran.r-project.org/doc/manuals/fullrefman.pdf>. 2010.

Rottier, P.J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H., Haijema, B.J. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is

determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14122-14130, 2005.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

Sharif, S., Arshad, S.S., Hair-Bejo, M., Omar, A.R., Zeenathul, N.A., Fong, L.S., Rahman, N.A., Arshad, H., Shamsudin, S., Isa, M.K. Descriptive distribution and phylogenetic analysis of feline infectious peritonitis virus isolates of Malaysia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, p. 1-7, 2010.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. **Biometry**. 2nd ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1981. 859p.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

Vennema, H., Heijnen, L., Rottier, P.J., Horzinek, M.C., Spaan, W.J. A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 4951-4956, 1992.

Vennema, H., Poland, A., Foley, J., Pedersen, N.C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. **Virology**, v. 243, n.1, p. 150-157, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

- As primeiras sequências obtidas de amostras brasileiras do FCoV, mostram que o gene 7b é altamente conservado e não há, portanto, relação entre deleções e atenuação da patogenicidade;
- Não há relação ancestral/descendente, baseada no gene 7b, entre as sequências obtidas de animais com e sem sinais clínicos de PIF, pondo em questão a teoria da mutação;
- As metodologias filogenéticas e filogeográficas descritas nesse trabalho são importantes ferramentas para tentar elucidar se há a participação de determinantes genéticos, relacionados a outros genes, na patogênese da PIF.