

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**JOANNA JÉSSICA SOUSA ALBUQUERQUE**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA ( FELV ) DE ANIMAIS PROCEDENTES DE  
ABRIGO DE SÃO LUÍS -MA**

São Luís – MA  
2017

**JOANNA JÉSSICA SOUSA ALBUQUERQUE**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA ( FELV ) DE ANIMAIS PROCEDENTES DE  
ABRIGO DE SÃO LUÍS -MA**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Ana Lúcia Abreu Silva

São Luís- MA  
2017

Albuquerque, Joanna Jéssica Sousa.

Diagnóstico sorológico e molecular do vírus da leucemia felina (FELV) de animais procedentes de abrigo de São Luís – MA/ Joanna Jéssica Sousa Albuquerque.– São Luís, 2017.

? f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Profa. Ana Lúcia Abreu Silva.

**JOANNA JÉSSICA SOUSA ALBUQUERQUE**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA ( FELV ) DE ANIMAIS PROCEDENTES DE  
ABRIGO DE SÃO LUÍS -MA**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Msc Nathália dos Santos Martins  
Mestre em Ciência Animal  
1º examinador

---

Prof<sup>ª</sup> Msc Renata Mondêgo de Oliveira  
Mestre em Ciência Animal  
2º examinador

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Lúcia Abreu Silva  
Doutora em Biologia Parasitária  
Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Solange de Araújo Melo  
Doutora em Biotecnologia  
Suplente

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família que me acompanhou em toda esta jornada, sendo os meus primeiros orientadores na vida. Agradeço especialmente aos meus pais e minha irmã que sempre me apoiaram em todos estes anos de esforço e estudo, fazendo o caminho mais fascinante e prazeroso. Cada dia ao lado de vocês faz eu me inspirar mais para me tornar uma pessoa que possa orgulhar vocês, quero que saibam que eu sempre busco honrar e orgulhar a vocês, obrigada por todo o esforço que fizeram para me criar, podem ter certeza que nada disto foi em vão. É bom saber que não importa onde eu vá, sempre terei para onde voltar, com pessoas que zelam e cuidam de mim.

A minha Orientadora Ana Lúcia Abreu Silva pela orientação ao longo desses anos e por confiar em mim para a execução deste trabalho, e sempre me apoiando a não desistir de realizar este sonho.

A Professora Nathália dos Santos Martins que me co-orientou no trabalho de iniciação científica e na execução da monografia. Só posso agradecer a Deus e a Professora Ana Lúcia por ter lhe colocado em meu caminho, você foi uma verdadeira mãe pra mim em todos estes anos de estudo e pesquisa, tudo o que eu conquistei com este trabalho eu devo a senhora. Obrigada pelas tardes trabalhando, pelos puxões de orelha e por exigir tanto de mim, eu sei que me tornei uma pesquisadora e uma pessoa melhor devido à sua influência, obrigada por tudo.

A Marcos Henrique Santos Ferreira, meu companheiro de vida, que mais que um namorado, é o meu melhor e mais precioso amigo, me apoiando sempre que eu não via mais saída, me suportando nos finais de período e fazendo os meus dias mais leves e felizes, você faz o meu mundo girar em câmera lenta, obrigada por me amar e cuidar de mim.

Aos professores do Curso de Medicina Veterinária pelos ensinamentos transmitidos e pelas dúvidas sanadas, o caminho do aprendizado só existiu porque vocês estavam lá. Obrigada por me tornar a profissional que hoje eu sou.

Agradeço a todos estagiários, doutores, técnicos e profissionais que trabalham na Clínica Veterinária Toca dos Bichos, vocês me fizeram ter um conhecimento prático da medicina veterinária, vocês abriram a minha mente para as oportunidades e fizeram eu me apaixonar ainda mais pela profissão que escolhi para minha vida. Agradeço especialmente a Jairo Ferreira, Tarsila Passos e Jackeline Rodrigues, além dos estagiários Gleice Caroline Mendes Bezerra e Gabriel de Oliveira Almeida que me acompanharam nas coletas para realização deste trabalho, e que dividiram comigo os dias mais corridos na clínica.

À todos os meus amigos da turma 79 de medicina veterinária por fazerem dos dias mais desafiadores os mais divertidos. Em especial a Leticia de Paula Botega, Marcella Matos, Brenda Karine, Sérgio Costa, Alcindo Neto e Leandro Veiga que direta ou indiretamente abriram os meus olhos para ver a vida por um ângulo completamente novo e maravilhoso, obrigada por sempre se fazerem presentes, e por me aceitarem como eu sou. Só tenho a agradecer a Deus por ter conhecido pessoas tão maravilhosas e diferentes quanto vocês. Alguém um dia disse que sempre que conhecemos uma pessoa, deixamos algo de nós para elas, assim como levamos algo delas conosco, se hoje eu sou quem sou, é porque tive a oportunidade de viver com vocês.

À todos os integrantes do laboratório de anatomia patológica que me acolheram quando eu precisava, em especial a Renata Mondego e Anderson Cássio por me ouvirem, me ensinarem, estarem presentes em momentos importantes da minha vida, por me fazerem ver outro lado da medicina veterinária e da pesquisa e por me aconselharem e, de certa forma, serem orientadores para a minha vida.

A UEMA pela formação profissional. Pela concessão de bolsas, e por permitir a execução deste trabalho, mesmo que com alguns entraves.

Aos proprietários que permitiram as coletas de amostras para realização do projeto. A AMADA, por nos permitir a realização de coletas ao longo do ano para execução do trabalho, em especial a Euzamar Pereira por permitir a coleta de amostras em animais sob sua tutoria, e por sempre apoiar a realização deste trabalho.

A Fapema pela concessão da bolsa.

Aos meus avós que sempre me apoiaram como puderam. Cada palavra que vêm de vocês é uma sabedoria que ninguém mais poderia me passar. E em especial a minha avó, Maria Helena, que sempre teve o sonho de me ver formada e feliz, espero que onde você estiver, possa sentir orgulho de mim, foi e sempre será a grande inspiração da minha vida.

*"Uma mente precisa de livros tanto quanto  
uma espada precisa de uma pedra de  
amolar".*

*(Tyrion Lannister)*



## Diagnóstico Sorológico e Molecular do vírus da leucemia felina (FeLV) de animais procedentes de abrigo de São Luís - MA

### RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar aspectos clínicos, e realizar a padronização da PCR para diagnóstico da leucemia felina no município de São Luís – MA. Amostras de sangue total de 50 felinos foram testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de detectar o DNA proviral com amplificação de um fragmento de 450pb do gene *gag* do FeLV, segundo Finoketti et al. (1993). Para detecção de antígeno p27 do FeLV, 50 amostras foram testadas utilizando o **kit comercial Leucemia e Imunodeficiência felina** Ag Test Kit (Aleré™). Obteve-se 8% (4/50) de positividade para FeLV considerando todos os testes utilizados. A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta uma sensibilidade de 90% (mesmo sem diferenciar FeLV endógeno do exógeno) e uma especificidade de 100%, sendo utilizado como teste confirmatório. A técnica de PCR empregada para identificação do gene *gag* identificava o DNA proviral, ou seja, sequências do DNA viral integradas ao genoma do hospedeiro. Sendo realizado ainda PCR do seguimento GAPDH, objetivando avaliar a eficácia das extrações e integridade do DNA e/ou presença de inibidores da PCR, o produto deste teste resultou em uma banda única de 709pb em gel de agarose, caracterizando sucesso nas amplificações de DNA segundo os iniciadores descritos por Pinheiro de Oliveira et al., (2013). Os principais clínicos observados foram: Halitose, salivação intensa, gengivoestomatite, faringite, sangramento oral, ulcerações em porção dorsal e lateral da língua, lesões em arco glossopalatino, caquexia, letargia, diarreia e animais que apresentavam co-infecções (sinais respiratórios) por outras doenças, devido à imunossupressão. A análise das variáveis hematimétricas e bioquímicas entre animais FeLV positivos e negativos não demonstraram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ). Não foram diagnosticados animais em co-infecção com a imunodeficiência felina, o trabalho êxito ao realizar a padronização das reações de PCR para o gene *gag*

Palavras-chave: Vírus da leucemia felina, Reação em cadeia da polimerase, Teste rápido, felinos.

## **Serological and molecular diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) from animals coming of shelter of São Luís - MA**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate clinical aspects and to perform standardization of PCR for the diagnosis of feline leukemia in the city of. Whole blood samples from 50 felines were tested by polymerase chain reaction (PCR) to detect proviral DNA with amplification of a 450 bp fragment of the FeLV gag gene, according to Finoketti et al. (1993). For the detection of FeLV p27 antigen, 50 samples were tested using the Leukemia and Immune Deficiency Ag Kit Kit (Alere™) kit. 8% (4/50) of FeLV positivity was obtained considering all the tests used. Polymerase chain reaction (PCR) has a sensitivity of 90% (even without differentiating endogenous FeLV from the exogenous) and a specificity of 100%, being used as a confirmatory test. The PCR technique used to identify the gag gene identified the proviral DNA, ie, viral DNA sequences integrated into the host genome. In addition, PCR of the GAPDH sequence was performed to evaluate the efficacy of extractions and DNA integrity and / or the presence of PCR inhibitors. The product of this test resulted in a single band of 709bp in agarose gel, characterizing success in the second DNA amplifications. The main clinical findings were: halitosis, intense salivation, gingivostomatitis, pharyngitis, oral bleeding, ulcerations in the dorsal and lateral portion of the tongue, glossopalatine arch lesions, cachexia, lethargy, Diarrhea and animals that had co-infections (respiratory signs) due to other diseases due to immunosuppression. The analysis of hematimetric and biochemical variables between FeLV positive and negative animals did not show statistically significant differences ( $p > 0.05$ ). No animals were diagnosed in co-infection with feline immunodeficiency, working successfully to standardize the PCR reactions for the gag gene.

**Key Words:** Feline leukemia virus, Polymerase chain reaction, Rapid test, feline

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 01</b> – Quantidade de reagentes e componentes utilizados para realização da PCR do gene GAPDH. .....	.....45
<b>Tabela 02</b> - Quantidade de reagentes e componentes utilizados para realização da PCR do gene GAPDH. ....	.....47
<b>Tabela 03</b> – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo origem dos animais. São Luís, 2016 .....	.....51

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 01:</b> Esquema representativo da partícula viral de um retrovírus. .....	21
<b>Figura 02:</b> Diagrama do pro vírus do FeLV demonstrando o produto da PCR obtido a partir d do gene <i>gag</i> .....	22
<b>Figura 03:</b> de incidência do FeLV no Brasil(A) e no Mundo(B) .....	24
<b>Figura 04:</b> Formas de transmissão do FeLV .....	26
<b>Figura 05:</b> Representação da replicação do vírus da Leucemia Felina. .....	28
<b>Figura 06:</b> Felino positivo para Leucemia Felina apresentando complexo gengivite, glossite, estomatite. .....	29
<b>Figura 07:</b> Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do fragmento de 244 pb do gene <i>gag</i> e sua localização no genoma. .....	44
<b>Figura 08:</b> Imagens da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo 0,01%) da PCR para a detecção de porção do gene GAPDH do DNA extraído da camada leucocitária de felinos, o produto apresenta 709pb. Observando-se a presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas. Canaleta 1 - Marcador de tamanho molecular 100pb; Canaleta 2 - controle negativo realizado com água ultrapura; Canaleta 3 - Produto da PCR, tendo amplificação do gene GAPDH .....	47
<b>Figura 09:</b> Registro Digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para detecção do Gene GAG extraído da camada leucocítica de felinos cujo produto possui 450 pb. Presença do DNA amplificável nas amostras utilizadas. Canaletas 1 e 10 - Marcadores de tamanho	

molecular 100 pb; Canaletas de 2 a 8- Produto da PCR apresentando amplificação do Gene *gag*, sendo o 2 o controle positivo. Canaleta 9 - Controle Negativo - Água ultrapura

.....48

**Figura 10:** Quadro dos testes para diagnóstico da leucemia felina em cada estágio de desenvolvimento da doença. (Adaptado de Hartmann et al., 2012). +: Positivo; -: Negativo; V: Variável; P: Provável; IP: Improvável

.....48

**Figura 11:** Recinto coletivo de felinos em abrigo para animais

.....53

**Quadro 01:** Fármacos antivirais e imunomoduladores utilizados para FeLV/FIV

.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AZT	3'-azido'3-desoxitimidina ou zidovudina
CA	Capsídeo
CCA	Centro de Ciências agrárias

<b>CEEA</b>	Comitê de Ética e Experimentação Animal
<b>CHCM</b>	Concentração de Hemoglobina Média
<b>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	Marcadores de superfície celular de Linfócitos T
<b>CA</b>	Proteínas do Capsídeo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b><i>env</i></b>	Gene que codifica proteínas do envelope
<b>EDTA</b>	Etilenodiaminatetracetato de sódio
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EnFeLV</b>	Forma endógena do FeLV
<b>FIV</b>	imunodeficiência viral felina
<b>FeLV</b>	Vírus da leucemia felina
<b>FAPEMA</b>	Fundo de Amparo a pesquisa e desenvolvimento do Maranhão
<b>FeTHTR1</b>	Feline High-affinity thiamine transporter 1
<b><i>gag</i></b>	gene que codifica as proteínas do capsídeo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfatodesdrogenase
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>IFA</b>	Imunofluorescência indireta por Anticorpos
<b>IFN</b>	Interferão
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IN</b>	Integrase
<b>LTR</b>	Sequências longas repetidas (‘‘Long Terminal Repeats’’)
<b>MA</b>	Proteína da matriz
<b>MI</b>	Mililitro
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ma</b>	miliampères
<b>MuLV</b>	Vírus da Leucemia Murina
<b>NC</b>	Proteína de Nucleocapsídeo
<b>NCBI</b>	Nacional Center for Biothechnology Information
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase(‘‘Polymerase Chain reaction’’)
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PPT</b>	Proteínas Plasmáticas Totais

<b>PR</b>	Protease
<i>pol</i>	gene que codifica a enzima transcriptase reversa
<b>RD144</b>	Forma endógena do FeLV
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT</b>	Transcriptase Reversa
<b>RT-PCR</b>	Real Time - PCR
<b>SU</b>	Glicoproteína de superfície
<b>TAE</b>	Tampão Tris - Acetato de EDTA
<b>TL-3</b>	Inibidor de Proteases
<b>TM</b>	Glicoproteína Transmembrana
<b>UEMA</b>	Universidade Estadual do Maranhão
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular Médio
$\mu\text{L}$	Microlitro
%	porcento
$\omega$	Omega
®	marca registrada
$\beta$	beta
$\kappa$	kappa
$\alpha$	alfa
$\gamma$	gamma
°C	graus Celsius
<b>Kg</b>	quilograma
<b>kV</b>	Kilovolts

## Sumário

LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	13
1. Introdução.....	18
2. Revisão de literatura.....	20
2.1. Vírus e Subtipos da Leucemia Felina .....	20
2.2. Epidemiologia e Distribuição.....	22
2.3. Transmissão .....	25
2.4. Patogenia .....	27
2.5. Sinais Clínicos.....	29
2.6. Diagnóstico .....	31
2.7. Prognóstico e Tratamento .....	34
2.8. Controle e Prevenção.....	39
3. Objetivos .....	41
3.1. Geral.....	41
3.1. Específicos .....	41
4. Materiais e Métodos .....	41
4.1. Animais.....	41
4.2. Composição das amostras.....	41
4.3. Local.....	42
4.4. Autorização à pesquisa e ficha clinico-epidemiológica.....	42
4.5. Coleta de Amostras .....	42
4.6. Processamento de Amostras .....	42
4.6.1. Exame Hematimétrico .....	42
4.6.2. Detecção de Antígenos do FeLV.....	43
4.6.3. Extração de DNA pró-viral .....	43
4.6.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	43
4.6.5. Eletroforese dos Produtos da PCR.....	45
4.6. Análise estatística .....	46
5. Resultados e Discussão .....	47
5.1 PCR GAPDH .....	47



5.2 PCR Gene <i>gag</i> .....	48
5.3 Prevalência da Leucemia Felina.....	51
5.4 Sinais Clínicos .....	52
6. Conclusões.....	54
Referências .....	55
Apêndice .....	67

## 1. Introdução

O vírus da leucemia felina (FeLV) pertence à família *Retroviridae* e foi primeiramente descrito em 1964 por Jarret e colaboradores durante estudo sobre linfomas em felinos (Jarret et al., 1964). O FeLV é um vírus pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Gammaretrovirus*. Todos os vírus da família *Retroviridae* possuem como material genético o RNA fita simples, utilizando-se da Transcriptase Reversa para sintetizar o DNA, sendo assim inserido ao genoma celular, além de possuírem um invólucro (Pereira & Tavares, 2002; Dunham & Graham, 2008; Lairmore, 2011; Hartmann, 2006). O provirus (condição em que se encontra o RNA retroviral após ser incorporado ao DNA da célula hospedeira) contém sequencias repetidas (LRT) com função regulatória e de controle da expressão dos genes virais. Entre os LRT's encontram-se os genes *gag*, *pol* e *env*. Sendo o gene *gag* responsável pela codificação de proteínas internas (p15, p12, p27 e p10), o *pol* codificante de proteínas voltadas para a replicação viral (integrase e RT) e o *env* codificante para as proteínas presentes no envelope viral (gp 70 e p15e) (Hartmann 2006).

O *Gammaretrovirus* do FeLV é transmitido pelo contato direto, frequente e prolongado entre animais, a partir da ingestão de água ou comida contaminadas, por meio de secreções infectadas, seja pelo leite, pelas secreções lacrimais, respiratória, urina e fezes, além de haver ainda a transmissão venérea ou durante a própria gestação (Hoover, mullins, 1991; Arjona et al., 2000).

O FeLV é classificado em quatro subgrupos, FeLV A, B, C e T identificados de acordo com diferenças no gene da SU e pela diferença dos receptores para acessar a entrada na célula hospedeira, apenas o subgrupo A é transmissível entre os felinos, sendo os grupos B e C derivados de mutações do subgrupo A e só foram encontrados em forma de co-infecção com este ultimo (Jarret et al., 1984; Loar 1993; Barr et al., 1997).

Após a infecção por FeLV, gatos com o sistema imunológico debilitado permanecem contaminados, resultando em complicações sistêmicas, como infecções secundárias, alterações hematológicas (anemia aplásica), neoplasias e tornando-se mais suscetíveis ao desenvolvimentos de zoonoses importantes como a toxoplasmose. Os gatos portadores de FeLV podem passar anos sem manifestar algum sintoma. Há uma grande variedade de sintomas que podem ser encontrados, sendo comum encontrar uma

queda no número das células vermelhas e brancas. O FeLV-A e B estão associados a linfomas, o subgrupo C é o mais patogênico, causa anemia aplásica e surge pela mutação na sequência da SU do FeLV-A (Hartmann, 2001).

Devido a sua patogenicidade, o vírus foi indicado como causador de pelo menos um terço de todas as mortes por neoplasias e um número considerável de mortes devido à anemia e infecções secundárias, pelo seu efeito supressivo da medula, bem como, dos órgãos linfoides (Hartmann, 2001).

Os felinos infectados por FeLV passam a produzir anticorpos específicos contra a proteína p27, desta forma, a detecção destes anticorpos no animal infectado, tem sido utilizado como a principal forma de diagnóstico destas doenças (Hartmann, 2001).

Os métodos diagnósticos para a FeLV são variados uma vez que dependendo da fase em que a infecção se encontra, esta pode não ser identificada. Muitos ensaios vêm sendo desenvolvidos para detecção do FeLV, estes podem ser divididos em: direto (que detectam a presença de antígeno ou ácidos nucleicos e o isolamento viral) e indireto (detecção de anticorpos). Para a detecção de antígenos podem ser utilizados testes de imunocromatografia, ELISA e IFA, sendo os resultados de sensibilidade e especificidade, bem como o princípio de funcionamento da imunocromatografia, semelhantes ao ELISA (Lutz et al., 2009). A detecção de RNA viral ou DNA proviral é realizada pela PCR convencional de sangue, medula óssea e tecidos (Levy et al., 2008).

Levantamentos epidemiológicos realizados recentemente no município de São Luís do Maranhão, demonstraram uma taxa reduzida de animais infectados. Segundo Coelho (2008), a alta positividade para FeLV encontrada em alguns estudos, pode se dar devido ao uso de métodos mais sensíveis. Deste modo, desenvolveu-se a pesquisa com o objetivo de realizar tais testes, buscando assim obter um melhor levantamento epidemiológico da Leucemia Felina em animais provenientes dos abrigos do município de São Luís - MA.

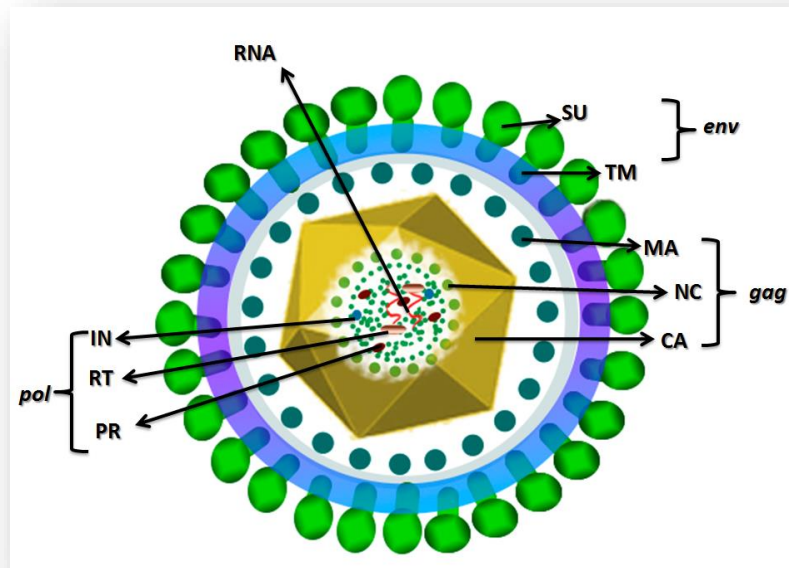
## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Vírus e Subtipos da Leucemia Felina

O vírus da Leucemia Felina tem como material genômico o RNA, de fita simples, pertencente à família *Retroviridae*, realizando a transcriptase reversa, a subfamília *Oncoviridae* e ao gênero *Gammaretrovirus*, sendo este composto por vírus endógenos e exógenos sendo classificados quanto à quantidade de hospedeiros que pode infectar, e pela quantidade de receptores na espécie viral (Nelson & Couto, 2001; Lairmore, 2011). Segundo Cotter (1998), este vírus se originou a cerca de um milhão de anos, a partir de uma mutação de um retrovírus de rato (vírus da leucemia murina - MuLV) que passou a infectar felinos após a ingestão de ratos infectados, devido a isto, o FeLV pode infectar uma grande variedade de felídeos, como por exemplo, o lince ibérico e o gato montês. Além da forma exógena, são conhecidas duas formas endógenas do FeLV, o enFeLV e o RD144 (sendo este último não patogênico). O enFeLV é incapaz de tornar-se patogênico devido ao seu genoma ser muito incompleto, o que impede a capacidade de replicação de forma independente, tornando inviável o desenvolvimento da doença (Cotter, 1998; Lutz, et al. 2009; Costa & Noorsworthy, 2011; Willett & Hosie, 2013)

O FeLV possui uma estrutura gênica simples composta pelos genes *pol*, *env* e *gag*. O gene *env* codifica proteínas necessárias para a formação do envelope viral, como a glicoproteína 70 (gp 70) e a proteína transmembranar 15E (p15e). A gp70 apresenta grande importância por ser extremamente antigênica e determinar o grau de patogenicidade de um vírus, bem como o seu tropismo. A p15e está associada diretamente com a gp70, sendo responsável por permitir a ligação da glicoproteína 70 à membrana celular do hospedeiro, além de causar a imunossupressão e anemia não regenerativa em felinos que apresentam infecção persistente. O gene *pol*(polimerase) codifica a transcriptase reversa, a protease e a integrase, sendo essenciais para a integração do genoma viral ao genoma celular. Gene *gag*(*group specific antigen*) codifica as proteínas estruturais(p27) que tem grande importância para o diagnóstico de infecções por FeLV, sendo encontradas grandes quantidades desta proteína tanto no plasma sanguíneo quanto no citoplasma de células dos animais infectados (Hardy Jr et al., 1976; Sousa & Teixeira, 2003; Lairmore, 2011; Hartmann, 2012).

Figura 01: Esquema representativo da partícula viral de um retrovírus



Legenda: SU - Glicoproteína de superfície; TM - Proteína transmembranar; MA - Proteína de matriz; NC- Núcleocapsídeo; CA - Capsídeo; IN - Integrase; RT - Transcriptase reversa; PR - Protease. Fonte: Albuquerque, 2017.

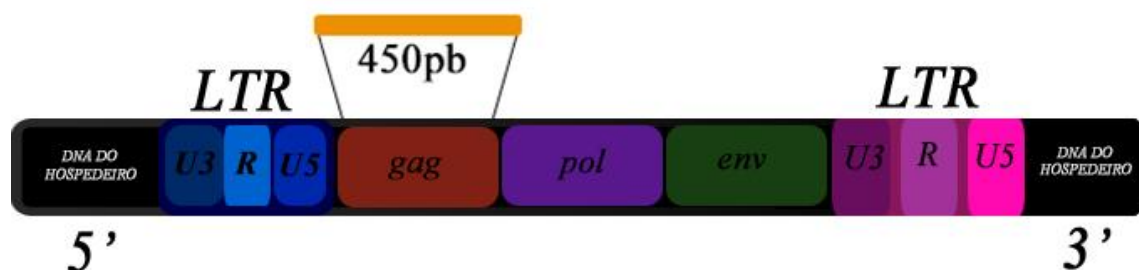
O vírus possui capacidade de formar neoplasias, isto acontece devido ao FeLV apresentar mecanismos oncogênicos que tem capacidade de ativar proto-oncogenes do hospedeiro e contrariam a ação do gene supressor de tumores e a indução de mutagênese através da inserção do DNA viral ao genoma do hospedeiro, causando assim uma alteração na estrutura e função dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular do hospedeiro (Coffin et al, 1997; Lee & Reddy, 1999).

Segundo pesquisa realizada por Ettinger e Feldman (1995), o vírion do FeLV apresenta espículas curtas e um núcleo arredondado e a partícula viral apresenta 80 a 100 nm, de diâmetro.

O FeLV é classificado em quatro subgrupos, FeLV A, B, C e T sendo distintos tanto pelas diferenças genéticas (genes *env*) e pelas diferenças funcionais (uso dos receptores para entrada na célula hospedeira) (Overbaugh & Bangham, 2001), entretanto, não é possível distinguir os subgrupos a partir dos testes de diagnósticos de rotina. O subgrupo A ocorrem em gatos virêmicos e podem desenvolver a doença sozinhos, podendo ser potencializado pelo subgrupo B (Arjona, 2007), entretanto, o subgrupo A, é o menos patogênico que os demais subgrupos. Uma vez que o FeLV A encontra-se no hospedeiro, ele se ligará às células a partir do receptor *Feline high-*

*affinity thiamine transporter 1* (feTHTR1), encontrada em tecidos como fígado, intestino Delgado, rins e células do sistema linfóide) (Mendonza et al., 2006). O subgrupo B pode provocar uma viremia crônica e está normalmente associado a linfomas (Hoover et al., 1977), e ocorre sempre em associação ao A, uma vez que sozinho não apresenta patogenicidade, isto acontece pois este subgrupo surgiu após uma recombinação dos genes *env* do subgrupo A. Já o subgrupo C raramente é isolado, tendo surgido a partir de mutações do gene *env* do subgrupo A, sendo responsável por apenas 1% das infecções por FeLV, devido a sua alta letalidade (levando os animais a óbito após poucas semanas da infecção devido a uma anemia aplástica severa), não é transmitido entre gatos. Recentemente foi descoberto o subgrupo T, sendo ainda pouco conhecida, também se originou de uma mutação no gene *env* do subgrupo A, apresenta tropismo por linfócitos T e devido a apresentar alto poder citolítico, causa uma imunossupressão severa( Norsworthy, 1993; Gwynn et al., 2000; Miyazawa, 2002; Ravazzollo & Costa, 2007).

Figura 02. Diagrama do pro vírus do FeLV demonstrando o produto da PCR obtido a partir d do gene *gag*



Fonte: Albuquerque, 2017

O FeLV replica-se primeiramente na orofaringe, disseminando-se pelo corpo para a medula óssea, principalmente nos linfócitos T, glândula salivar e epitélio respiratório. O vírus não apresenta citopacidade, saindo da célula por brotamento (Cotter, 1998).

## 2.2. Epidemiologia e Distribuição

O vírus da leucemia felina está disseminado em todo o mundo, sendo uma importante causa de mortalidade de felinos. Para Coelho (2003), a prevalência de animais infectados com o FeLV varia de acordo com localização geográfica e estilo de vida da população felina, uma vez que a taxa de incidência da infecção aumenta quanto

maior a densidade populacional dos felinos, tornando gatis e ambientes domésticos com muitos felinos um local mais propício ao desenvolvimento e transmissão do vírus, a taxa de infecção pode ainda ser potencializada quando os animais tem acesso ao ambiente externo (Arjona et al., 2006).

Em um estudo realizado na Europa e Estados Unidos, demonstrou que há uma maior prevalência de animais infectados na França(19%), enquanto nos Estados Unidos, houve uma positividade de apenas 14,81% (Braley, 1994). Análise sorológica realizada no Reino Unido, utilizando-se o método de ELISA apresentou uma positividade de 14% (Hosie, et al, 1989). Na Ásia, observou-se uma prevalencia de 5,8% tanto em Istambul, quanto na Turquia(Yilmaz et al., 2000). Em Sydney observou-se uma soropositividade de apenas 2%, dentre 200 gatos considerados saudáveis (Malik et al., 1997), já em Madrid, obteve-se uma prevalência maior, apresentando uma positividade para o vírus de 15,6 (Arjona, 2000), resultado aproximado encontramos na Itália. com uma prevalência de 8,4%, sendo maior em felinos machos de rua (Bandedchi et al., 2006 ).

Na Polônia, em um estudo com 676 animais, observou-se que aproximadamente 43 animais eram positivos para o FeLV, obtendo-se uma taxa de 6,4% (Rypula et al., 2004). Já no Japão, em um estudo realizado por Maruyama et al (2003), obteve-se uma taxa de 9,8% de animais positivos para o vírus. Em Portugal observou-se taxas de soropositivos semelhantes em duas cidades, Moita e Lisboa, apresentando taxas de 10% e 10,9% respectivamente (Rosado, 2009; Duarte, 2010; Rodrigues, 2012).

Westman et al, (2016) realizou uma análise epidemiológica em diversas cidades da Austrália, observando uma taxa de infecção maior para o vírus da imunodeficiência felina (FIV), que para o FeLV. O estudo australiano, observou ainda que animais infectados pelo vírus da leucemia felina, normalmente também estão infectados com o vírus da imunodeficiência felina. Westman et al. (2016), observou ainda uma taxa relativamente baixa de animais infectados com o vírus da leucemia felina, apresentando uma variação de 0 a 11% em diferentes áreas da Austrália.

Os dados encontrados no Brasil apresentam uma grande variação. Sendo encontrado uma prevalência de 12,6 % de animais infectados com o FeLV, em estudo realizado por Barbosa et al. (2001), 47,5% por Coelho et al. (2011), sendo ambos os estudos realizados em Minas Gerais, e 17,4%, no Rio de Janeiro, por Souza et al.

(2002). Meinerz et al (2010) encontraram uma prevalência de 38,3% no Rio Grande do Sul, em São Paulo, Hagiwara et al (1997) encontraram uma abrangência de felinos infectados com FeLV de 12,5%.

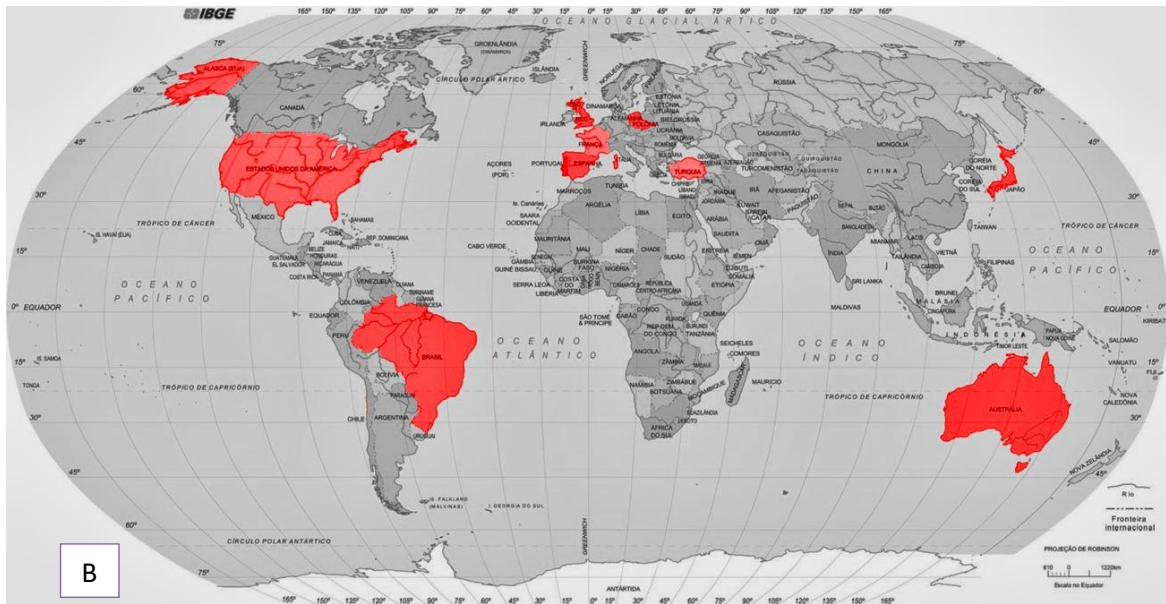
Em trabalho realizado em Belo Horizonte, pode-se observar que 32,5% dos animais estudados estavam infectados com FeLV, destes 22,5% eram fêmeas, e 10% eram machos (Teixeira et al., 2007). Martins et al. (2015) comprovou a presença de FIV e FeLV em São Luís - MA. Obtendo uma proporção de FIV (cerca de 18,33% das amostras) muito maior que a de FeLV (apenas uma amostra infectada, dentre as 120 disponíveis).

Em estudo mais recente publicado por Coelho et al (2011) realizado novamente em Belo Horizonte, observou o DNA proviral do FeLV em 507 dos 1072 animais analisados, obtendo assim uma positividade de 47,5%. Para Coelho (2011) a grande variação deste resultado quando comparado com estudos sorológicos realizados no Brasil ocorre devido à variação de sensibilidade entre as metodologias utilizadas, tendo em vista que em testes sorológicos como Elisa e IFA apresentam um elevado número de resultados falso negativos, o que raramente acontece em testes moleculares que ainda conseguem detectar o vírus na fase inicial da infecção (Tandon et al., 2008).

Figura 03: Mapa de incidência do FeLV no Brasil(A) e no Mundo(B)







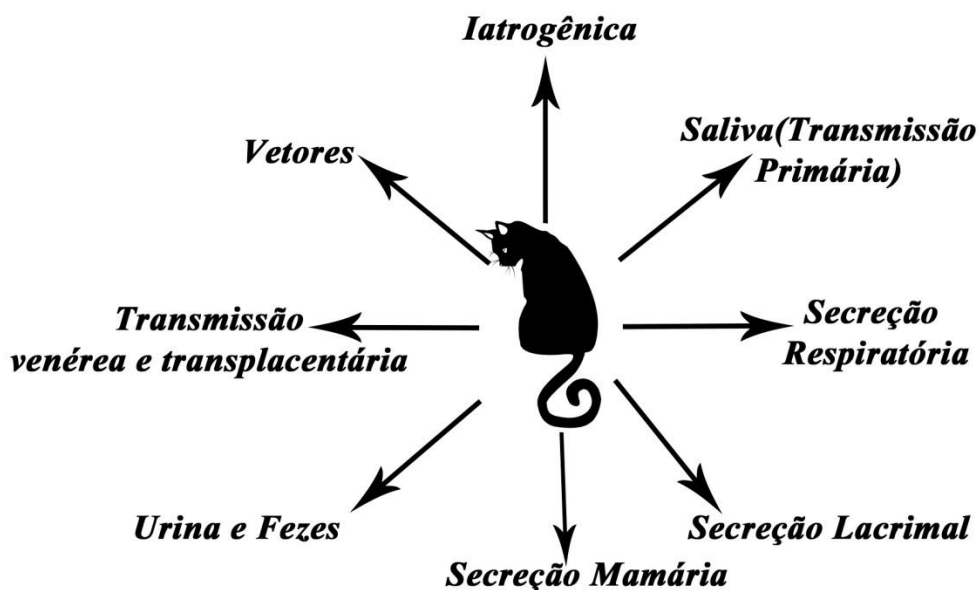
Fonte: Albuquerque, 2017

Outra explicação para as variações, podem ser explicadas devido a análise de diferentes grupos de animais, pois, os que tem acesso a rua ou vivem em abrigos compõem um grupo de risco, possuindo uma maior probabilidade de se infectar com o vírus, além disto, a prevalência de FeLV é maior em gatos machos com idade de um a seis anos (Ettinger & Feldman, 1995; Meinerz et al., 2010).

### 2.3. Transmissão

O FeLV pode ser transmitido pelo contato oronasal, sendo a transmissão horizontal a mais importante, uma vez que os gatos virêmicos liberam o vírus constantemente, mesmo que não apresentem sinais clínicos da doença (Rojko&Hardy, 1994). A saliva do felino infectado apresenta uma grande carga viral(maior que o plasma), tornando assim o contato com a saliva uma forma de transmissão primária(Cotter, 1998). Arjona (200) afirma que há uma grande quantidade de vírus nas secreções respiratórias, lacrimais, leite, urina e fezes, além da ocorrência da transmissão venérea e transplacentária (Harbour et al., 2002). Rojko Hardy (1994) levantam ainda a possibilidade de transmissão desse vírus por meio de vetores, uma vez que o FeLV já foi encontrado no aparelho bucal de mosquitos. A transmissão iatrogênica pode acontecer a partir do contato com instrumentos ou agulhas contaminadas, transfusão sanguínea (Cotter, 1998).

Figura 04: Formas de transmissão do FeLV



Fonte: Albuquerque, 2017

A transmissão vertical durante a gravidez pode acontecer, porém normalmente resultam em nati-mortos ou muito fracos, morrendo logo após o nascimento. Entretanto, caso a fêmea apresente uma infecção regressiva, é pouco provável que haja a transmissão do vírus à ninhada, embora alguns dos filhotes possam se infectar após o nascimento, isto acontece devido ao vírus poder manter-se em estado de latência nas glândulas mamárias até que haja o desenvolvimento da mesma durante o período final da prenhez. Gatas que apresentem uma infecção regressiva com eliminação, tendem a ter filhotes com presença de anticorpos, que lhe darão imunidade por cerca de 3 meses (HARDY Jr et al., 1976; Pacitti et al., 1986; Lutz et al., 2009; Costa & Norsworthy, 2011)

Os felinos mais jovens apresentam uma maior suscetibilidade ao FeLV que os adultos, tendo como maior causa de mortalidade a imunossupressão (aproximadamente 80% em animais virêmicos), seguida dos aparecimentos de tumores, especialmente os linfomas (aproximadamente 20%) (Pontier et al., 1998).

Animais que apresentem doenças concomitantes, que vivam em uma área com grande densidade populacional, com falta de higiene ambiental, com grande acesso ao exterior, especialmente machos não castrados (devido às disputas territoriais)

apresentam uma maior probabilidade de desenvolver a Leucemia Felina (Ettinger & Feldman, 2010; Bande et al., 2012).

O FeLV é pouco resistente ao ambiente, podendo ser destruído em um período de 4 horas, quando exposto às condições ambientais normais. Isto acontece devido ao envelope viral lipídico apresentar alta solubilidade e sensibilidade a desinfetantes, detergentes, calor e ressecamento, podendo ser facilmente controlado em um ambiente com desinfecção ambiental adequada (Whitney, 2003).

#### **2.4. Patogenia**

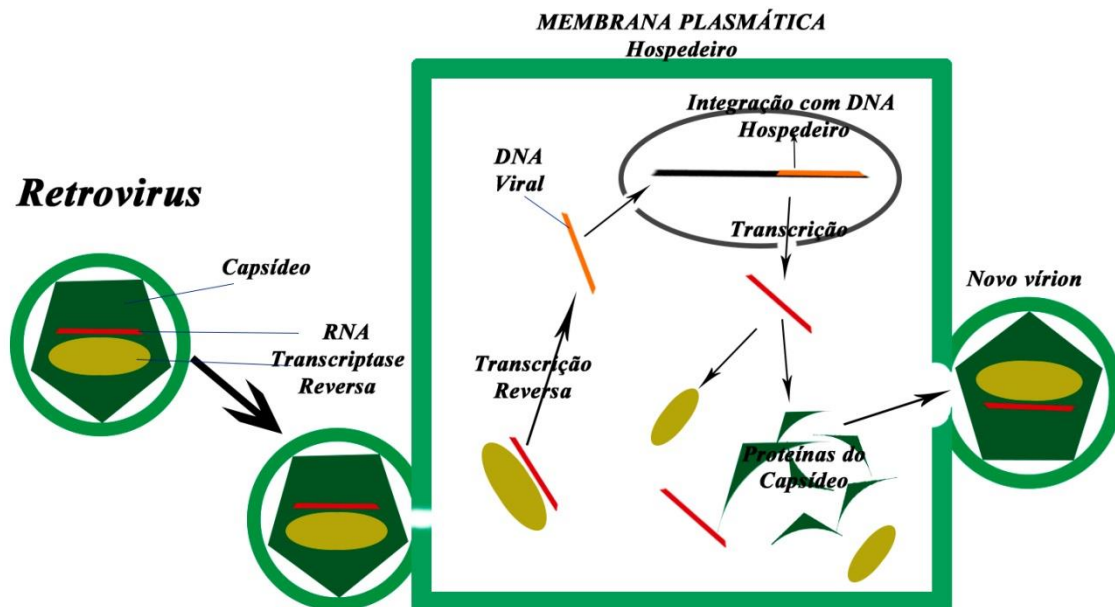
Após a infecção pela região oronasal, ocorre a replicação viral em tonsilas e linfonodos da região da faringe, em casos de infecção ocorridas devido a ferimentos ou mordeduras, a replicação viral acontece no linfonodo mais próximo do local (Hirsh & Zee, 1999). Desta forma, o patógeno passa a infectar leucócitos circulantes (apresentando uma preferência para células do sistema mononuclear, como Linfócitos B, monócitos e macrófagos), iniciando assim a disseminação sistêmica do vírus, a disseminação ocorrerá no baço, tecidos linfóides associados ao intestino, linfonodos, células epiteliais das criptas intestinais, timo, pulmão, cérebro, rins e células precursoras da medula óssea. Posteriormente, há uma liberação de plaquetas e neutrófilos infectados da medula óssea para a circulação, levando a infecção para diversos tecidos glandulares e epiteliais (glandulas salivares e bexiga) (Torres, Mathiason & Hoover, 2005; Sellon & Hartman, 2006).

Uma vez que o vírus se integra ao DNA, o hospedeiro fica permanentemente infectado. O período de latência pode durar anos, ou pode se ativar inesperadamente, podendo ser passado para os descendentes devido a uma replicação defeituosa do vírus (Whitney, 2003).

Células individuais podem ser infectadas pelo FeLV quando a gp70 se liga aos receptores celulares específicos, o que gera a liberação do genoma viral na célula hospedeira. A transcriptase reversa e a DNA-polimerase da célula hospedeira, transformam o RNA viral em DNA de fita-dupla, chamado de provírus, que se integra ao genoma hospedeiro durante a fase de divisão celular. Desta forma, sempre que o DNA hospedeiro transcrever um gene, também será transcrito os genes do FeLV. Além do acúmulo de proteínas virais no citoplasma da célula hospedeira, o pro-vírus pode

ainda alterar ou ativar alguns proto-oncogenes, levando à mutagênese, formando assim uma célula neoplásica (Sparkes e Papasouliotis, 2012).

Figura 05: Representação da replicação do vírus da Leucemia Felina.



Fonte: Albuquerque, 2017

De acordo com o uso de técnicas de detecção viral, pode-se caracterizar a patogenia pelo FeLV das seguintes maneiras: Infecção abortiva, que se caracteriza por impedir a replicação viral, devido a uma resposta imune eficiente. Infecção regressiva, onde observa-se a ocorrência de replicação nas tonsilas e linfonodos regionais, onde o animal desenvolve uma resposta imune ao patógeno, controlando assim a infecção (Rojko et al., 1979); Infecção latente, em que se observa uma viremia em um período superior a três semanas, ocorrendo infecção das células da medula óssea, após alguns meses, o animal pode desenvolver uma resposta imune capaz de debelar a doença, porém, o DNA proviral já encontra-se integrado às células do sistema imune (Rojko et al., 1979; Hatmann, 2006); Infecção persistente/progressiva, ocorre em animais com sistema imune debilitado ou incapaz de controlar a infecção, ocorrendo a disseminação viral, resultando na eliminação do vírus ao ambiente (Hardy et al., 1973; Sparkes, 1997). Animais que apresentam este tipo de infecção normalmente morrem dentro de 3 anos (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008); Infecção local ou atípica, que se caracteriza pela produção intermitente ou de baixos níveis de antígeno, sendo a replicação viral local atípica (Hartmann, 2012)

Em felinos infectados, observa-se uma linfopenia, devido à uma diminuição de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Ocorre ainda uma diminuição quantitativa dos Linfócitos T CD8<sup>+</sup>, no início da doença, o que mantém uma proporção de CD4/CD8 dentro dos limites normais. Com o tempo, o número de células CD8<sup>+</sup> se recuperam, causando uma diminuição da proporção CD4/CD8 (Tizard, 2002).

## **2.5. Sinais Clínicos**

O vírus da leucemia felina apresenta uma grande associação à doenças degenerativas e proliferativas, podendo estar associado à doenças neoplásicas ou não (Coelho, 2003; Lappin, 1998). A sintomatologia clínica da leucemia felina se desenvolve apenas nos animais persistentemente infectados, sendo geralmente os animais com idades entre 2 e 4 anos, tendo em vista que os animais jovens apresentam uma maior suscetibilidade devido ao sistema imune não ser ainda tão eficiente (Lutz et al., 2009).

Os sinais clínicos variam de acordo com o tipo de doença e de órgão envolvido, sendo em sua maioria casos fatais (Norsworthy, 1998), sendo os mais comumente encontrados: mucosas pálidas, dispnéia, letargia, anorexia, emagrecimento progressivo, febre, gengivite, estomatite, uveíte, diarreia e abscessos que não cicatrizam e recorrentes (devido a imunossupressão), podendo sentir massas na região abdominal à palpação, além de aumento de órgãos como baço, fígado e rins (Torres, Mathiason & Hoover, 2005), linfomas, leucemias mieloides e linfóides, imunossupressão, enterite, supressão de medula óssea e desordens reprodutivas (Lutz et al., 2009). No hemograma e perfil bioquímico, pode-se identificar anemia normocítica não regenerativa, ou macrocíticas, leucopenia, trombocitopenia, aumento de enzimas hepáticas e de bilirrubina sérica (Cohn, 2006; Amorin da Costa e Norsworthy, 2011).

Figura 06. Felino positivo para Leucemia Felina apresentando complexo gengivite, glossite, estomatite.



Fonte: Albuquerque, 2017

Segundo Mehl (2001), as principais neoplasias associadas ao FeLV são linfomas, fibrossarcomas e doenças mieloproliferativas. Em geral, os linfomas são classificados de acordo com suas localizações, sendo reconhecidas pelo menos quatro formas: o linfoma mediastínico apresentam dispnéia, tosse, regurgitação e cianose. Sendo este tipo mais encontrado em filhotes (Norsworthy, 1998); Linfoma alimentar, tendo as formas tumorais mais associadas ao trato digestivo, sendo mais comum em animais idosos; Linfoma multicêntrico, se concentrando principalmente em linfonodos; e o linfoma de forma atípica ou extranodal, tendo os tumores associados aos rins, pele, olhos ou sistema nervoso.

O principal, e mais frequente sinal do FeLV é a imunossupressão, que causa uma maior suscetibilidade à infecções uma vez que diminuirá a quantidade de linfócitos T auxiliares, comprometendo a resposta imunológica primária e secundária para a produção de anticorpos (Merck, 2006;Cotter, 1998). Algumas proteínas virais, como a p15E apresentam ação imunossupressora afetando a ação de interleucina 2, consequentemente impedindo a maturação de linfócitos B. O FeLV ainda causa perda de linfócitos CD4+ e CD8+ , atrofia do timo, e neutropenia com alterações das funções de neutrófilos (Lafrado et al., 1987; Mehrotra et al., 2003).

Em animais positivos para o vírus, observa-se anemias de diversos tipos, sendo a maioria do tipo não regenerativa. Este tipo de anemia normalmente é rara e causada por alguns tipos de patógenos, como o *Mycoplasma haemofelis*, ou a processos imunomediados que resultam em hemólise de eritrócitos. O FeLV causa mielossupressão devido a aplasia eritrocitária, o que impede a diferenciação de precursores dos eritrócitos na medula óssea (Kociba, 1986; Quigley et al., 2000).

Em felinos soropositivo é observado ainda distúrbios da reprodução, como infertilidade, reabsorção e aborto (normalmente no final da gestação). A infecção do filhote pode ocorrer pela via intra-uterina, durante a amamentação ou no momento do nascimento (Torres, Mathiason & Hoover, 2005). Em alguns casos, o filhote não se infecta, entretanto, a maioria dos animais manifestam a doença e morrem cedo, podendo apresentar a "síndrome do gatinho apagado", apresentando dificuldade em mamar, desidratação, hipotermia, atrofia do timo e morte nas primeiras semanas de vida (Cotter, 1998).

## **2.6. Diagnóstico**

O diagnóstico baseado na detecção do anticorpo é de pouco valor, uma vez que os animais desenvolvem anticorpos contra seu próprio vírus endógeno, ou seja, animais que não estão verdadeiramente infectados, resultando assim nos falso-positivos (Sparkes., 2003; Pinches et al., 2007). Deste modo, os métodos de diagnóstico direto, que possuem uma sensibilidade por detectar os antígenos e não anticorpos, são mais utilizados, assim, os anticorpos maternos ou vacinais não interferem no diagnóstico (Hartmann, 2012).

Os teste diagnósticos de rotina, ainda se utiliza da identificação dos anticorpos contra a proteína p27, encontrada no núcleo do vírus. As técnicas mais utilizada para identificação da proteína viral são o ensaio de imunofluorescência direta (IFA) e o teste de ELISA.

O IFA foi o primeiro método diagnóstico que permitiu a identificação de animais virêmicos na prática clínica. O teste baseia-se na detecção das proteínas expressas pelo gene *gag*, a partir da detecção do antígeno p27 no citoplasma de granulócitos e plaquetas em amostras sanguíneas (Amorim da Costa; Norsworthy, 2011), entretanto, os animais positivos devem estar com pelo menos 6 a 8 semanas de viremia. O teste pode ainda apresentar falsos negativos caso o animal apresente

leucopenia, uma vez que a detecção do FeLV ocorre em leucócitos (Hawks et al., 1991; Hartmann., 2006;Hartmann., 2012).

É considerado o teste preferido para a FeLV por apresentar uma especificidade um pouco maior que o ELISA e apresentar uma alta correlação com infecções persistentes. A pesquisa de IFA pode ser negativa em infecções recentes e positivas transitórias no ELISA, uma vez que só se identifica um animal positivo após ocorrer a infecção na medula óssea, sendo necessário pelo menos três semanas de viremia (Sherding.,2008; Hartmann., 2012).

Este teste pode ser realizado com esfregaço de sangue fresco, esfregaço de medula óssea ou mesmo amostra de sangue coletada com EDTA ou heparina (Harvey, 2012). A ocorrência de animais falso-positivos neste teste, pode ocorrer devido a baixa qualidade do esfregaço sanguíneo ou presença de aglomerados de plaquetas ou eosinofilia (Sherding, 2008)

O teste de ELISA apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 90%, especificidade superior a 98% e grande praticidade (COUTO, 1994), a versão comercializada deste teste é denominada de SNAP COMBO FeLV/FIV (IDEXX, USA), que é uma membrana contendo anticorpos anti-FeLV p27 e antígeno do FIV p24, o material biológico utilizado pode ser saliva, lágrimas, sangue total, plasma ou soro (Hartmann, Werrner & Egberin, 2001), entretanto, desaconselha-se o uso de sangue total, lágrimas e saliva por facilitarem a ocorrência de falso-positivos, uma vez que destas amostras podem apresentar positividade para a versão endógena do vírus, caracterizando assim um animal falso-positivo (Sherding., 2008). Devido a sua facilidade em ser realizado, baixo custo, e disponibilidade, é o método mais utilizado em clínicas veterinárias para o diagnóstico da leucemia felina. Entretanto, o animal positivo pode ser identificado em apenas 1 a 2 semanas após início da viremia, caracterizando um bom teste para triagem (Harmann., 2012;).

O teste de ELISA pode ainda apresentar diagnósticos de falsos positivos e negativos por diversos motivos,por exemplo em casos de animais que apresentem a infecção na fase de regressão da doença podem apresentar uma viremia transitória, resultando em uma amostra positiva para o teste, que caso seja repetido alguns meses depois, apresenta um resultado negativo. Por outro lado, caso o animal apresente uma infecção latente em que não seja possível detectar os antígenos circulantes, o resultado



do teste será negativo. Desta forma, se faz necessário que o teste de ELISA seja confirmado com outro teste, em especial nos casos em que o animal apresente-se saudável (Jarret & Hosie, 2004), indica-se que os animais sejam testados pelo IFA ou novamente pelo ELISA após um período de quatro a oito semanas (Mehl., 2001), pode ser utilizado ainda PCR para DNA proviral (Lutz et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta uma sensibilidade de 90% (mesmo sem diferenciar FeLV endógeno do exógeno) e uma especificidade de 100%, sendo utilizado como teste confirmatório. Consiste em detectar as sequências de ácido nucleico do FeLV (RNA viral ou o DNA proviral) encontrados no sangue, medula óssea ou e tecidos. É útil na detecção da infecção regressiva ou latente por FeLV em animais que apresentem linfomas, síndromes de depressão da medula óssea ou apresentem lesões inflamatórias gengivo-orais (Hayes, et al., 1992; Jackson et al., 1993; Uthman et al., 1996; Sherding., 2008; Stützer et al., 2010).

Para identificação de felinos que apresentem infecção regressiva, pode-se realizar a quantificação do DNA proviral, podendo identificar a presença do material proviral mesmo quando este já encontra-se integrado ao genoma das células da medula óssea ou dos tecidos linfóides (Torres et al., 2005). No caso da PCR em tempo real para o RNA viral, há uma detecção de vírus no plasma, ou nas secreções que apresentam-se abaixo da sensibilidade dos testes para o antígeno viral. Tornando possível a detecção mesmo a níveis muito baixos do vírus na saliva nos mesmos animais que possuíam resultado negativo em testes de antígeno convencionais (Gomes-Keller et al., 2006). A RT-PCR apresenta uma sensibilidade maior que a PCR convencional (92%), porém, uma especificidade ligeiramente menor (99%).

O isolamento viral é realizado a partir da cultura viral do sangue ou da medula óssea. Este teste, assim como a PCR, é confirmatório, sendo utilizado principalmente em pesquisa, visto a baixa disponibilidade para o uso clínico. É um teste considerado de padrão ouro para identificação da infecção progressiva do FeLV, podendo detectar o vírus mesmo em fases iniciais da infecção (Levy et al., 2008; Sherding., 2008; Hartmann., 2006; Lutz et al., 2009).

A pesquisa de anticorpos neutralizantes é um método diagnóstico que apresenta uma eficácia limitada, seja no diagnóstico, seja na avaliação clínica da infecção. Caso haja uma titulação positiva, pode-se afirmar apenas que houve uma exposição previa ao

vírus seja por vacinação, ou por infecção, não podendo confirmar a persistência de uma infecção ativa. Animais que estejam com infecção regressiva são dados como falso-negativos (Sherding., 2008; Hartmann., 2012). Para Tandon et al(2005) para que seja realizado um diagnóstico preciso de um animal com FeLV, e a caracterização do seu estado de infecção, é recomendado a combinação de pelo menos dois métodos diagnóstico.

## **2.7.Prognóstico e Tratamento**

Os animais infectados pelo FeLV podem manter uma via saudável por meses ou anos antes que qualquer sintoma se manifeste. Em estudo realizado na Alemanha, observou-se que o tempo de vida dos felinos infectados eram de aproximadamente 732 dias a menos que a dos felinos saudáveis. Entretanto, a expectativa de vida da maioria dos animais que apresentam viremia persistente é de 2 a 3 anos após o aparecimento dos primeiros sinais da doença (Lorentzen &Levy., 2006; Gleich et al., 2009).

Ainda não existe um tratamento eficaz para a eliminação do FeLV, uma vez que o animal se infecta, assim o permanecerá pelo resto da vida. Porém, a identificação de um animal infectado com o FeLV não é razão para eutanásia, portanto, buscando-se uma melhora na qualidade de vida do animal a partir de terapêutica que busca controlar os níveis de viremia enquanto fortalece o sistema imune do animal (Cohn., 2006; Ettinger & Fieldman., 2010).

Uma vez identificada a infecção no animal, o mesmo deve ser isolado, de modo a evitar as infecções secundárias, entretanto, tal medida é pouco realizado em gatis ou locais com grande densidade populacional (Levy J et al., 2008; Ettinger & Fieldman., 2010). É indicado ainda que seja realizado o controle veterinário a cada seis meses, sendo verificado o peso do animal, e realizando controle da contagem de células brancas. O acompanhamento médico do animal deve incluir exames como hemograma, painel bioquímico e urinálise (Richards., 2005; Levy J et al., 2008; Ettinger &Fieldman., 2010). Machos e fêmeas infectados devem ser castrado, de modo a evitar a transmissão pela via transplacentaria, a partir da lactação e permitindo ainda a diminuição do estresse causado devido ao estro ou comportamento de acasalamento, e resultando em uma menor propensão a fugir de casa ou interações agressivas com outros felinos (Cohn, 2006; Levy et al., 2008; Amorim da Costa & Norsworthy., 2011).

A vacinação em animais infectados é uma questão ainda muito discutida na comunidade acadêmica, uma vez que os animais soropositivos reagem fortemente a vacinação, podendo ainda causar uma progressão doença. Recomenda-se portanto que em caso de vacinação, que sejam usadas vacinas inativas em vez das modificadas vivas (Richards et al., 2006., Belak et al., 2009; Ettinger & Fieldman., 2010). Caso o tutor não se responsabilize em manter o animal infectado dentro de casa, pode ser indicada a vacinação contra raiva. Tendo em vista que os animais FeLV-positivos apresentam um sistema imunológico depreciado, levando a uma proteção incompleta e encurtada, é indicado vacinações mais frequentes, em especial caso o animal tenha acesso à rua (Lutz et al., 2009; Amorim da Costa & Norsworthy., 2011; Hartmann, 2012a)

Em casos de cirurgias, é indicado o uso profilático de antibióticos, de modo a prevenir a infecção por agentes patogênicos secundários. A exposição a outros felinos doentes, também não é indicada, em especial àqueles que apresentam doenças infecciosas respiratórias ( Levy J. et al., 2008; Belak et al.,2009; Lutz et al., 2009).A alimentação é de grande importância para evitar o desenvolvimento da doença. Para tanto, é indicado que se evite a alimentação à base de alimentos crus (Lutz et al., 2009).

O tratamento para o FeLV ainda está em desenvolvimento e a maioria dos medicamentos existente não são utilizados devido a sua alta toxicidade, falta de eficácia, altos custos e falta disponibilidade em alguns países. Os agentes antivirais interferem na replicação viral por diferentes mecanismos, seja a partir do impedimento do vírus a interagir com os receptores celulares, inibição da fusão da membrana viral à membrana celular, bloqueando a transcrição reversa ou inibindo a maturação viral (Mohamamadi & Bienxie ., 2012; Taffin et al., 2014).

A terapia com uso de Interferons tem sido de grande sucesso devido às propriedades antivirais, em altas doses, e imunoestimulantes, em baixas doses. Para a realização desta terapia, são utilizados dois tipos de interferons: O interferon  $\omega$  felino (inibe a replicação viral, porém não reverte a viremia) e o interferon  $\alpha$  humano (diminui os níveis de viremia, tornando-se inativo após seis ou sete semanas, quando os animais desenvolvem anticorpos contra a proteína humana). O interferon  $\alpha$  felino não é muito utilizado por não possuir propriedades antivirais, podendo aumentar a replicação viral (Lutz et al., 2009; Gómez et al., 2012; Gil et al., 2013).

O tratamento antiviral utilizado na rotina clínica contra retrovíruses é a Azidotimidina (AZT), um composto que atua travando a transcrição reversa, além de possuir um efeito imunomodulador e antiviral. O tratamento com este composto causa uma melhora na sintomatologia clínica, em especial na gengivite e estomatite. Entretanto, o tratamento com este medicamento é aceito por apenas cerca de dois anos. Devido a seus efeitos mielossupressores que resultam em anemia não regenerativa, é indicado o acompanhamento do hematócrito dos animais, em caso de um resultado menor que 20%, o tratamento deve ser interrompido e retomado após duas ou três semanas com apenas metade da dose (Bisset L. R., 2002; Sellon & Hartmann., 2006; Belak et al., 2009). Em felinos infectados que apresentem anemia não regenerativa, não é indicado, uma vez que causará uma exarcebada mielossupressão, além de anemia não regenerativa já presente (Ettinger & Fieldman, 2010; Levy et al, 2008; Amorim da Costa & Norsworthy., 2011; Hartmann., 2012a; Sparkes & Pappasoulotis., 2012).

Um outro tratamento que pode prevenir ou mesmo causar uma regressão às alterações causadas no sistema nervoso de animais infectados por retrovíruses, é com o inibidor de proteases TL-3. O uso de eritopoetina ou do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) são indicados em casos de neutropenia. Entretanto, pode ser desenvolvidos anticorpos contra estas substâncias após o início do tratamento (Huitro-Resediz et al., 2004; Phillips et al., 2005).

Segundo Harmann (2012a), alguns antivirais já foram utilizados em gatos infectados, como a zalcitabina, suramin, foscarnet e ribavirina, sendo ainda necessários estudos controlados *in vitro* para que a sua eficácia se confirme em animais FeLV-positivos.

A acemanana é um polímero de cadeia longa, polar, derivado da *Aloe vera* que apresenta atividade imunomoduladora, não apresentando porém uma melhora relevante nos sinais clínicos ou hematológicos do animal quando administrado na dose de 2mg/kg (Hartmann, 2012a). Outro produto indicado tem como base na bactéria *Propionibacterium acnes* morta, permitindo assim a estimulação dos macrófagos, o que resulta na liberação das citocinas. Este produto quando utilizado na dose de 0,25-0,5 ml/IV, em duas doses semanais, em semanas alternadas em um período de 4 meses apresenta efeito benéfico no tratamento da leucemia felina (Sherding. 2008; Hartmann., 2012a).

A proteína A presente nas paredes celulares de *Staphylococcus aureus* utilizada na dose de 10 mg/kg via intraperitoneal com suas aplicações no período de 10 semanas apresenta um resultado variado, podendo causar benefício ou manter os valores hematológicos ou sistema imune constantes (Sherding., 2008; Hartmann, 2012a). *Serratia marcescens* é um imunostimulante que causa uma ativação de macrófagos felinos normais derivados da região da medula óssea liberando IFNs, resultando em um aumento da temperatura corporal, assim como da contagem de neutrófilos (Hartmann 2012a).

O levamisole é um antihelmintico com atividade imunostimulante utilizado em felinos FeLV-positivos por Cotter (1991), porém, sem efeito comprovado em estudos controlados (Hartmann, 2012a). Outro agente antiparasitário utilizado como imunostimulante para animais FeLV positivos é a Dietilcarbamazina, sendo observado uma prevenção de linfomas em estudo realizado por Hartmann(2012a).

O uso de imunostimulantes inespecíficos apresentou resultados muito conflitantes, uma vez que além da estimulação do sistema imunológico, causam uma ativação nas células infectadas, o que resulta no aumento do nível de replicação viral (Birchard & Sherding, 2006; Belak et al., 2009).

No Quadro 1 observa-se os fármacos mais utilizados em tratamento de FIV e FeLV.

Quadro 1- Fármacos antivirais e imunomoduladores utilizados para FeLV/FIV

Droga	Categoria	Vírus
Azidotimidina (AZT)	Antiviral	FIV/FeLV
Acemanana	Imunomodulador	FIV/FeLV
Bacilo de Calmette-Guérin	Imunomodulador	FIV/FeLV
Lactoferrina Bovina	Imunomodulador	FIV/FeLV
Didanosina	Antiviral	FIV/FeLV
Dietilcarbamazina	Imunomodulador	FIV/FeLV
Interferon $\gamma$ felino	Imunomodulador, antiviral	FIV/FeLV

Levamisole	Imunomodulador	FIV/FeLV
Imunomodulador de linfócitos T	Imunomodulador	FIV/FeLV
PIND-AVI, PIND-ORF	Imunomodulador	FIV/FeLV
<i>Propionibacterium acnes</i>	Imunomodulador	FIV/FeLV
<i>Serratia marcesnes</i>	Imunomodulador	FIV/FeLV
<i>Staphylococcus proteína A</i>	Imunomodulador	FIV/FeLV
Suramina	Antiviral	FIV/FeLV
Zidovudina	Antiviral	FeLV

Além dos tratamento imunomediados, há ainda a opção do tratamento sintomático, que consiste na identificação e tratamento adequado às sintomatologias do animal (Lutz et al., 2009; Ettinger &Fieldman, 2010).

Pode-se utilizar corticoesteroides, entretanto a longo prazo, apresenta a imunodepressão como principal efeito adverso. Nestes casos, é indicado o uso de metronidazol ou clindamicina (Shelton et al., 1990; Sellon & Hartmann, 2006).

A diminuição do *stress*, bem como o uso de uma dieta balanceada garantem ao animal um aumento na expectativa de vida (Sellon & Hartman2006; Ettinger &Fieldman., 2010). Deve ser evitado a alimentação com base em carne ou ovos crus e leite não pasteurizado, para evitar os riscos de infecções transmitidas por alimentos. Deve ser realizada lavagem, e trocas diárias dos potes de comida e água, para se evitar o crescimento bacteriano e fungico. A limpeza da caixa de areia deve ser realizada semanalmente, enquanto o esvaziamento deve ser uma prática diária (Sherding, 2008; Schmeltzer, 2012b).

Em casos de infecções secundárias, é utilizado antibioticoterapia mais agressivas, mesmo que o antígeno seja mais comum, como *Mycoplasma haemofelis*. Em casos de anemia pode ser necessária transfusão sanguínea (Lappin., 2006; Levy J. et al.,2008a).

Em casos de desenvolvimento de linfoma, o protocolo baseia-se em quimioterapia, podendo haver remissão de alguns, entretanto, este procedimento não tem qualquer ação nos níveis virêmicos (Gunn-Moore, 2008; Lutz et al., 2009). Linfoma ou leucemia não tratados levam ao óbito do paciente em poucas semanas ou meses, a quimioterapia, por sua vez pode levar a remissão da doença em alguns gatos por vários anos. As drogas normalmente utilizadas são: ciclofosfamida, vincristina e prednisona. Entretanto, o prognóstico destes pacientes a longo prazo ainda é ruim, tendo em vista que a infecção subjacente por FeLV facilita a recorrência da doença, bem como desenvolvimento de outras doenças significativas (Sherding., 2008; Amorim da Costa & Norsworthy., 2011. Hartmann., 2012a; Sparkes & Papasouliotis., 2012).

## **2.8. Controle e Prevenção**

O modo ideal para o controle da leucemia felina é o isolamento do animal infectado, de modo a evitar o contato com animais não infectados (Baar, 1998). Nos abrigos, é indicado que todos os animais virêmicos sejam eutanasiados, sendo necessário ainda repetir testes a cada três meses até que não apareça mais animais positivos (Greene, 1998).

É importante que o diagnóstico da infecção seja de alta acurácia, pois a falha na identificação dos animais infectados leva a exposição e transmissão para os animais não infectados, enquanto o resultado falso-positivo pode levar a modificações impróprias no estilo de vida de um animal, ou mesmo à sua eutanásia (Levy et al., 2008).

A falta de exigência dos veterinários e dos tutores com as recomendações de testes em felinos soropositivos pode ser causada devido a falta de conhecimento a cerca da natureza vitalícia das infecções retrovirais, falta de comunicação ou custos (Little et al., 2011). Para tanto, é indicado que seja cobrada uma taxa diferencial para realização de testes em animais assintomáticos e taxas mais elevadas para os testes em animais doentes.

A melhor prevenção é a vacina, indicada para os animais não infectados e que apresentem alto risco de exposição aos animais de rua, à animais domiciliares com acesso à rua ou os que vivem em casa aglomerado com vários gatos, especialmente os filhotes (Mehl, 2001).

A primeira vacina foi introduzida em 1984, baseada na preparação de antígenos de FeLV. A vacina mais utilizada consiste em utilizar um canarypox vírus modificado que codifique glicoproteínas do envelope e do capsídeo do FeLV. A replicação viral acontece apenas uma vez, permitindo a expressão dos genes virais. No caso de contato com vírus, a estimulação do sistema imune leva à produção rápida dos anticorpos de neutralização (Sparkes, 2003; Lutz et al., 2009).

As vacinas disponíveis no mercado são inativas, sendo a maioria produzida do vírus completo, porém, ainda existem vacinas de vírus recombinante (Loar, 1993). A vacina contra o FeLV é considerada ainda não essencial, sendo portanto administrada apenas em felinos das categorias de risco específicas (Sherding., 2008; Schmeltzer, 2012a).

Caso seja necessária a vacinação é aplicada em duas doses, com um intervalo de três a quatro semanas, a primeira dose pode ser dada a partir da oitava semana. Após as doses iniciais da vacina, é indicado que se faça o reforço após um ano (em animais considerados sob risco de exposição), já foi sugerido que a partir dos 3 a 4 anos de idade o reforço seja realizado a cada 2 a 3 anos, uma vez que a suscetibilidade à infecção pelo FeLV diminui ao longo da vida (Lutz et al., 2009; Hartmann., 2012). Realizada a vacinação, o animal deve ser confinado por duas semanas, para garantir que a resposta imune seja completamente ativada antes que haja a exposição ao risco (Sherding., 2008; Little et al., 2011; Schmeltzer., 2012a).

A vacina não oferece uma eficácia total de proteção, entretanto, mesmo os animais vacinados pode ocorrer um nível mínimo de replicação viral ocorre, entretanto, estes não desenvolvem viremia ou transmitem o vírus (Willet & Hosie, 2013). A vacinação oferece uma baixa proteção especialmente em ambientes com alta exposição ao vírus (Hartmann., 2012a).

Em clínicas veterinárias, os animais infectados com FeLV devem ser alojados em gaiolas separadas em adotando-se medidas preventivas, uma vez que estes animais encontram-se imunodeprimidos, não sendo portanto indicado que sejam alojados juntos com outros animais com doenças contagiosas. Devido ao vírus não ser muito resistente sem hospedeiro, medidas como lavagem de mãos, uso de detergentes e procedimentos de limpeza comuns são suficientes para a prevenção da transmissão no ambiente hospitalar (Levy et al., 2008; Hartmann, 2012a).



Em gatis ou abrigos, os animais devem ser testados antes da admissão ou adoção, sendo necessário isolar todos os animais que chegam ao abrigo, em especial nas áreas com alta prevalência do vírus. Após o primeiro teste, é indicado que o animal seja testado novamente após seis semanas, buscando garantir a detecção dos animais recentemente infectados, animais adotados e devolvidos ao abrigo também devem ser testados (Levy et al., 2008; Möstl et al., 2013).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

Realizar o Diagnóstico sorológico e molecular do vírus da Leucemia Felina de animais procedentes de abrigos de São Luís - Ma

#### **3.2. Específicos**

- Determinar a ocorrência dos vírus da Leucemia felina no município de São Luís – MA;
- Caracterizar alterações clínicas em felinos positivos para FeLV;
- Avaliar valores hematológicos de animais positivos e negativos para FeLV;
- Comparar as técnicas de PCR e Snap Combo FIV/FeLV para o diagnóstico do vírus da Leucemia Viral Felina.

### **4. Materiais e Métodos**

#### **4.1. Animais**

Para composição da amostra foram utilizados 50 gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), selecionados independentemente de sexo, raça, idade e modo de vida, apresentando ou não sinais clínicos de qualquer doença.

#### **4.2. Composição das amostras**

Os elementos componentes da amostra foram selecionados aleatoriamente de maneira não probabilística por conveniência, sendo oriundos:

- 1 – animais errantes do campus da UEMA; e,
- 2 – gatos mantidos em abrigos de animais no município de São Luís – MA.
- 3 - Gatos domiciliados.

### **4.3. Local**

A pesquisa foi desenvolvida em etapas, a saber:

1. Coleta: Conforme amostra;
2. Teste rápido para detecção do antígeno do vírus da Leucemia, Imunodeficiência, Panleucopenia Felina e Coronavírus: Laboratório de Anatomia Patológica/CCA/UEMA;
3. Hematologia: Laboratório de Patologia Clínica/CCA/UEMA.
4. PCR: Laboratório de Patologia Molecular/CCA/UEMA

### **4.4. Autorização à pesquisa e ficha clínico-epidemiológica**

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, com numero de protocolo 041/2014.

Para inclusão dos animais na pesquisa, as coletas foram realizadas mediante autorizações dos tutores através de termo de consentimento livre e esclarecido. Neste mesmo momento, dados referentes ao animal, tutor e situação clínica, além de informações epidemiológicas, foram coletados e registrados em ficha específica.

### **4.5. Coleta de Amostras**

Foram coletados 4mL de sangue de cada animal por punção da veia jugular externa, utilizando-se tubos tipo “vacutainer” com e sem anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), acoplado a agulha 25 x 0,8mm, estéreis, para exames hematimétricos e extração de soro para realização do exame sorológico, e para realização do Teste rápido para Fiv e FeLV.

### **4.6. Processamento de Amostras**

#### **4.6.1. Exame Hematimétrico**

No Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, foram avaliadas as séries vermelha e branca a partir de sangue total. O volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro. Os esfregaços sanguíneos corados pelos métodos Panótico e Giemsa para realização o diferencial leucocitário. As técnicas utilizadas seguiram o protocolo descrito por KANECO et al. (1997).

#### **4.6.2. Detecção de Antígenos do FeLV**

As amostras de soro foram submetidas a testes para verificar a presença de antígeno p27 da Leucemia felina e p24 da Imunodeficiência Felina, utilizando o **kit comercial Leucemia e Imunodeficiência felina Ag Test Kit (Alere™)** no Laboratório de Anatomia Patológica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, sendo interpretadas conforme as recomendações do fabricante.

#### **4.6.3. Extração de DNA pró-viral**

A extração DNA foi precedida utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) lote numero: 13270837, no laboratório biologia molecular da UEMA, seguindo criteriosamente o protocolo e recomendações do fabricante. Com o objetivo de estabelecer a mesma concentração de DNA para todas as amostras, as mesmas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se uma alíquota de 2µL e posteriormente armazenadas a - 20°C até a realização da PCR.

#### **4.6.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

##### ***4.6.4.1. PCR para avaliar a viabilidade das amostras***

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Após as extrações de DNA, todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene da enzima GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) de acordo com Pinheiro de Oliveira et al., (2013), para verificar a qualidade e eficiência da extração e a integridade do DNA obtido. As sequências dos iniciadores utilizados foram: GAPDH F- GGTGATGCTGGTGCTGAGTA e GAPDH R- CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT.

Foi utilizada uma solução mastermix contendo 5,1µL de Green GoTaq® Flexi Buffer5x (Promega, EUA), 1,9µL de cada iniciador (5pmol/µL - Sigma), 0,5µL de dNTPmix (10mM- Promega, EUA) 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (10mM – Promega, EUA), 0,26µL de Go TaqFlexiDNAPolymerase (500U-Promega, EUA), 2,0 µL de DNA template e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) para o volume final de 25µL. Como controle negativo foi utilizado apenas o mastermix de reagentes da PCR acrescido de 2,0 µL de água.

**Tabela 01:** Quantidade de reagentes e componentes utilizados para realização da PCR do gene GAPDH.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (µL)</b>
<b>Green GoTaq®</b>	5,1
<b>Iniciadores</b>	1,9
<b>dNTPmix</b>	0,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5
<b>DNAPolymerase</b>	0,26
<b>Água Ultrapura</b>	2,0
<b>TOTAL</b>	25

Fonte: Albuquerque, 2017

As reações de PCR foram conduzidas no termociclador convencional GeneMate Series que consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um constituindo de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização de 54°C por 30 segundos, extensão da polimerase a 72°C por 50 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Após os ciclos, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo, sendo observado um fragmento de 709pb.

#### **4.6.4.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR) para FeLV**

Para a detecção do FeLV foram realizadas duas PCR's convencionais para detecção do provírus nos leucócitos do sangue periférico, sendo utilizados oligonucleotídeos iniciadores senso 5' ACTAACCAATCCCCACGC-3', e anti-senso 5' ATGGCTGTCCCCTAGAG-3', desenhados com base nas sequências do gene *gag* para o FeLV que são encontrados no banco de dados do National Center for Biothechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que amplificam um fragmento alvo de 450 pb, segundo descrito por Finoketti et al., (2011). Esta técnica foi processada no Laboratório de Patologia Molecular (UEMA).

**Figura 07:** Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do fragmento de 244 pb do gene *gag* e sua localização no genoma.

INICIADOR	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')	REGIÃO	REFERÊNCIA	FRAGMENTO
FeLV	ACTAACCAATCCCCACG C	<i>Gag</i>	Finoketti et al., 2011	450pb
FeLV	ATGGCTGTCCCACTAGA G			
GAPDH F	GGTGATGCTGGTGCTGA GTA	GAPDH	Oliveira et al., 2012	709pb
GAPDH R	CCCTGTTGCTGTAGCCA AAT			

Adaptado de Hohdatsu et al., 1992.

Após extraído, o DNA foi submetido à PCR. Com exceção do DNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente em um mix contendo: 5,1 µL de Green GoTaq® Flexi Buffer 5x (Promega, EUA), 1,9 µL de cada iniciador (5pmol/ µL - Sigma), 0,5 µL de dNTPmix (10mM - Promega, EUA), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (10mM - Promega EUA), 0,26 µL de Go TaqFlexiDNAPolymerase (500 U - Promega, EUA), 2,0 µL de DNA template e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-life Technologies ®, EUA) para um volume final de 25 µL. Como controle negativo utilizou-se apenas o mastermix de reagentes da PCR acrescido de 2,0 µL de água. A reação ocorreu em um termociclador convencional PCR GeneMate Series, consistindo em uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido uma desnaturação realizada em 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, anelamento realizado no tempo de 1 minuto com uma temperatura de 94°C, e extensão em 1 minuto a 72°C tendo um passo final de 5 minutos a 72 °C, amplificando assim um fragmento de 450 pb para o gene *gag*.

Após os ciclos, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo. Os controles positivos e negativos foram utilizados em cada conjunto de amplificação.

#### 4.6.5. Eletroforese dos Produtos da PCR

Foram submetidos à eletroforese a uma voltagem constante de 100V e corrente de 2,0 A por 45 minutos, 10µL de cada amostra submetida à PCR em gel de agarose a

1,5% (Ultra Pure <sup>TM</sup> - Invitrogen) em tampão TAE 1X (20,3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,4mM Tris-acetato, 10mM EDTA ph 8,0), corado com brometo de etídeo (1µL/ml).

**Tabela 02:** Quantidade de reagentes e componentes utilizados para realização da PCR do gene gag.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (µL)</b>
<b>Green GoTaq®</b>	5,1
<b>Iniciadores</b>	1,9
<b>dNTPmix</b>	0,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5
<b>DNA Polymerase</b>	0,26
<b>Água Ultrapura</b>	2,0
<b>TOTAL</b>	25

Fonte: Albuquerque, 2017

Uma alíquota de 10 µL do amplicon foi aplicada ao gel de agarose para comparação visual, sendo utilizado um marcador padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen, lote numero 1735579). O gel foi visualizado por meio de um transluminador com exposição à luz ultravioleta, e fotografado no sistema de fotodocumentação de géis (L-PixLoccus Biotecnologia).

#### **4.6. Análise estatística**

Após tabulados e compactados, os dados foram apresentados em forma de tabelas e figuras, conforme a variável observada.

Procedeu-se com análise de variância (ANOVA) comparando as médias das variáveis hematimétricas (VG, Hemácias, Hemoglobina, CHGM, VGM, Leucócitos, Segmentados, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Bastonetes, PPT, Plaquetas) com as médias dos grupos de animais positivos e negativos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

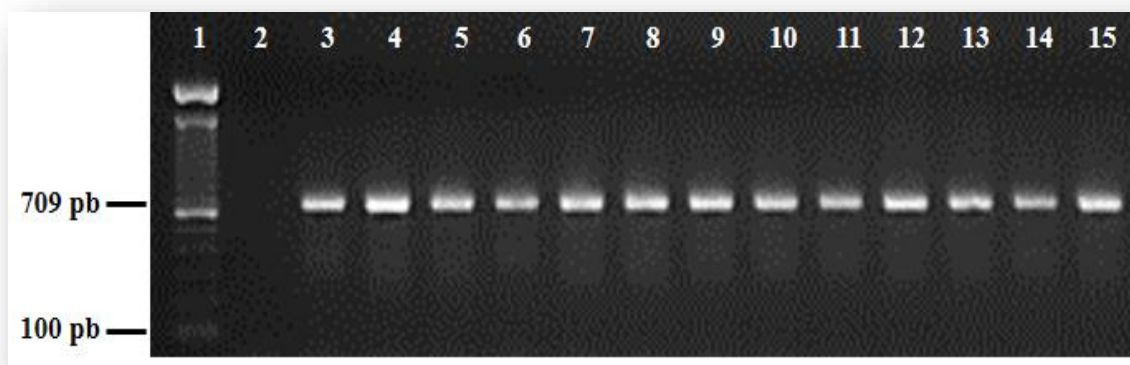
As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico GraphPadInstat versão 3.05. Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando-se um nível de significância mínima de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 PCR GAPDH

Objetivando avaliar a eficácia das extrações e integridade do DNA e/ou presença de inibidores da PCR, todas as amostras foram submetidas ao teste com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R que amplificam uma parte do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Figura08). O produto da PCR deste oligonucleotídeo resultou em uma banda única de 709pb em gel de agarose, caracterizando sucesso nas ampliações de DNA segundo os iniciadores descritos por Pinheiro de Oliveira et al., (2013). O uso de pares de oligonucleotídeos ou sondas direcionadas a uma sequência de DNA que contem genes constitutivos presente em amostras de sangue de mamíferos vem se tornando padrão em diversos estudos (Birkenheuer et al., 2003; Pelt-Verkuil et al., 2008). Tendo em vista que devido a presença de componentes inibidores presentes em células sanguíneas resultando em um resultado falso-negativo, o gene codificante da enzima GAPDH foi utilizado para verificação da presença de DNA amplificável. Todas as amostras estudadas foram amplificadas para o gene, confirmando assim a ausência de degeneração do DNA e de inibidores da PCR, o que diminui as chances de amostra falso-negativas.

Figura 08: Imagens da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo 0,01%) da PCR para a detecção de porção do gene GAPDH do DNA extraído da camada leucocitária de felinos, o produto apresenta 709pb. Observando-se a presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas.



Canaleta 1 - Marcador de tamanho molecular 100pb; Canaleta 2 - controle negativo realizado com água ultrapura; Canaleta 3 - Produto da PCR, tendo amplificação do gene GAPDH.

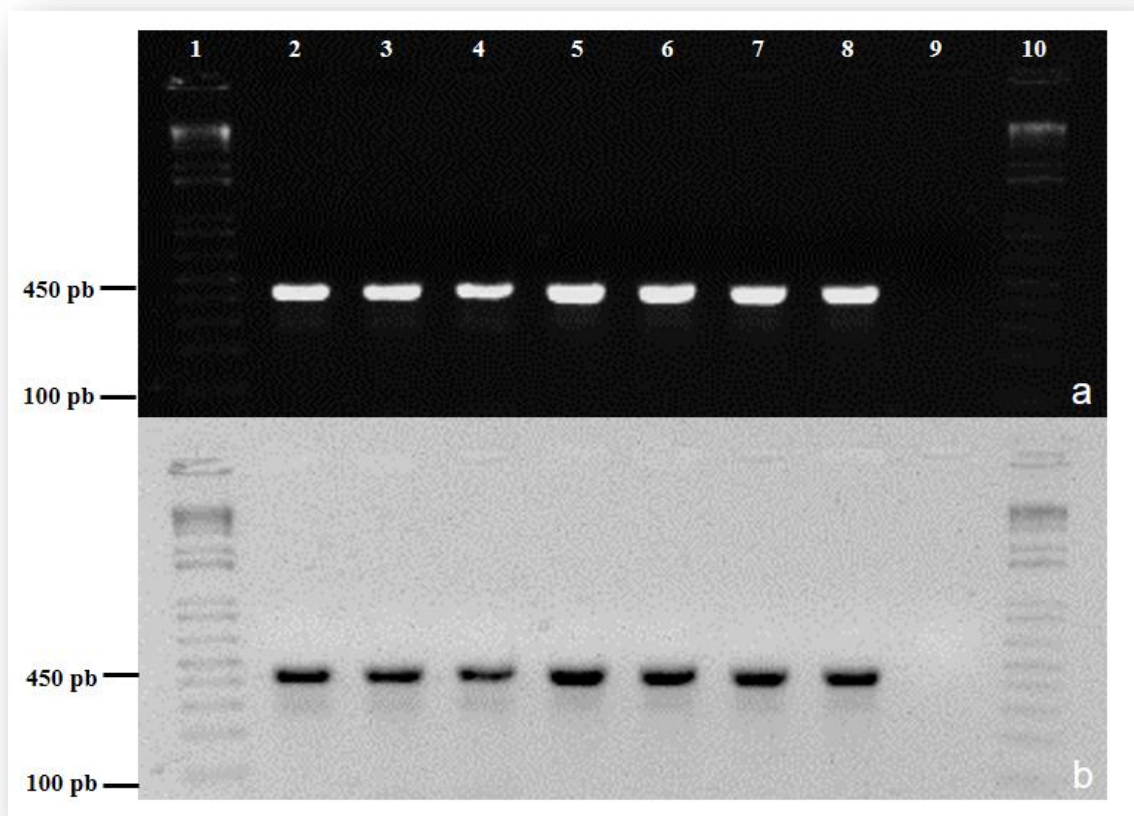
## 5.2 PCR Gene *gag*

Quanto a PCR para o gene *gag* do FeLV obteve-se uma boa amplificação, apresentando produtos de 450pb (Figura 09), sendo observados de acordo com o local de anelamento dos oligonucleotídeos do gene, segundo Finoketti et al (2011), demonstrando um teste eficiente na amplificação dos fragmentos de DNA proviral.

Os animais diagnosticados como soropositivos a partir dos testes rápidos foram testados pela PCR convencional para confirmação da doença. A técnica de PCR empregada para identificação do gene *gag* identificava o DNA proviral, ou seja, sequências do DNA viral integradas ao genoma do hospedeiro. Para que haja replicação viral é necessário que o RNA viral seja transformado em DNA de fita dupla, a partir da ação da transcriptase reversa. Uma vez integrado, o DNA viral torna-se permanente na célula enquanto ela estiver viva. A partir de então, sempre que houver transcrição do DNA do hospedeiro, haverá também a transcrição e tradução do mRNA viral (Murphy, 1999). O vírus é então liberado da célula, tendo a partícula viral maturada e infectante a partir da ação da enzima protease, que processará as proteínas precursoras *pol* e *gag* (Luciw, 1996).

Figura 09. Registro Digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para detecção do Gene GAG extraído da camada leucocítica de felinos cujo produto possui 450 pb. Presença do DNA amplificável nas amostras utilizadas. Canaletas 1 e 10 - Marcadores de tamanho molecular 100 pb;





Canaletas de 2 a 8- Produto da PCR apresentando amplificação do Gene *gag*, sendo o 2 o controle positivo. Canaleta 9 - Controle Negativo - Água ultrapura. Fonte: Albuquerque, 2017

Embora a PCR seja um teste de alta sensibilidade pode haver alguns animais falso negativos, pois uma vez que haja o desenvolvimento da infecção latente, ou seja, o vírus chegar à medula óssea, a sorologia não consegue mais identificá-lo, e a PCR realizada no presente estudo foi desenvolvida a partir de amostras de sangue total (camada leucocitária). O grande desafio do estudo da leucemia felina é a determinação de qual teste apresenta uma maior probabilidade de identificar a verdadeira fase de infecção da doença. Segundo Miyazawa et al (1997), animais infectados podem apresentar um resultado negativo para a pesquisa viral caso o vírus esteja em um compartimento tecidual diferenciado, como medula óssea e o sistema linfóide. A PCR é um teste de grande importância na detecção da infecção em sua fase regressiva (latente), em especial em animais que apresentem linfomas, síndromes de depressão medular ou lesões inflamatórias gengivais e orais (Hayes et al., 1992; Jackson et al., 1993; Uthman et al., 1996; Sherding, 2008; Stützer et al., 2010).

Figura 10: Quadro dos testes para diagnóstico da leucemia felina em cada estágio de desenvolvimento da doença. (Adaptado de Hartmann et al., 2012).

<b>Estágios da infecção (FeLV)</b>	<b>Antígeno p27 no sangue</b>	<b>Cultura viral do sangue</b>	<b>RNA viral dos tecidos</b>	<b>DNA proviral no sangue</b>	<b>Cultura viral de tecido</b>	<b>Excreção viral</b>	<b>Doenças associadas</b>
<b>Progressiva</b>	+	+	+	+	+	+	<b>P</b>
<b>Regressiva</b>	-	-	-	+	-	-	<b>IP</b>
<b>Abortiva</b>	-	-	-	-	-	-	<b>IP</b>
<b>Focal</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	+	<b>V</b>	<b>IP</b>

Legenda: +: Positivo; -: Negativo; V: Variável; P: Provável; IP: Improvável.

Fonte: Albuquerque, 2017

Os testes diagnósticos baseados na detecção de anticorpos apresentam pouco valor para a determinação da leucemia felina, uma vez que os animais podem desenvolver anticorpos para o vírus endógeno, sendo um animal falso positivo que não necessariamente apresenta-se infectado com o FeLV (Sparkes, 2003; Pinches et al., 2007). Para Torres et al. (2005), animais expostos ao FeLV porém não apresentaram antigenemia, são animais que conseguiram eliminar o vírus antes que ocorresse a integração do provírus ao DNA do hospedeiro (infecção abortiva), ou casos em que a replicação viral pode ser retida à partir do bloqueio da produção na circulação e tecidual das células infectadas (infecção regressiva). A infecção latente ocorrem com maior facilidade em animais com uma capacidade de resposta imunológica diminuída, sendo incapazes de conter a progressão da infecção inicialmente, estes animais apresentam antigenemia nas primeiras semanas em níveis considerados moderados de DNA proviral. Os animais incapazes de conter a progressão da infecção apresentam elevados níveis da proteína p27 e do DNA proviral em um período superior a três anos após sua infecção, este tipo de infecção é denominada de progressiva. A infecção latente é a completa ausência de antigenemia/viremia, porém com persistência do vírus cultivável na medula óssea apresentando uma potencial reativação. Infecções focais ou atípicas podem ser observadas também, e consistem na persistência da replicação viral local atípica, levando a uma produção intermitente ou de níveis relativamente baixos de antígeno p27, nestes casos, os testes de antígenos apresentam resultados fracamente positivos ou discordantes. Fêmeas com este tipo de infecção podem transmitir o FeLV

para os filhotes pela via transmamária (Hofmann-Lehmann et al., 2008; Hartmann, 2012).

### 5.3 Prevalência da Leucemia Felina

Das 50 amostras coletadas, 58% (29/50) eram de abrigos de animais, 20% (10/50) eram domiciliados, 22% (11/50) de animais errantes do Campus da UEMA (Tabela 01).

**Tabela 03** – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a origem dos animais. São Luís, 2016

<b>Origem dos animais</b>	<b>Quantidade</b>
Felinos domiciliados	20% (10/50)
Animais errantes do Campus da UEMA	22% (11/50)
Animais de Abrigos	58% (29/50)
Total	100% (50/50)

Dos animais estudados, 8% (4/50) apresentaram infecção por FeLV. Em trabalho realizado em Minas Gerais, pode-se observar uma média de 32,5% dos animais estudados, infectados com FeLV (Teixeira et al., 2007), número não tão aproximado ao resultado obtido no presente estudo, onde apenas 8% (4/50) dos animais estavam infectados.

Martins et al. (2015) realizou estudo semelhante, comprovando a presença de FIV e FeLV em São Luís - MA. Sendo a proporção de FIV (cerca de 18,33% das amostras) muito maior que a de FeLV (apenas uma amostra infectada, dentre as 120 disponíveis), o presente estudo apresentou uma quantidade maior de animais infectados com a leucemia felina. Tornando-se necessárias mais pesquisas para melhor acompanhamento da prevalência do FeLV no município de São Luis - MA.

Westman et al (2016), observou que animais infectados pelo vírus da leucemia felina, normalmente também estão infectados com o vírus da imunodeficiência felina. Porém, a maioria dos animais infectados com FIV, não possuíam infecção por FeLV (Westman et al., 2016), o nosso trabalho não houveram animais que apresentaram co-infecção por FIV e FeLV. Westman et al. (2016), observou ainda uma taxa

relativamente baixa de animais infectados com o vírus da leucemia felina, bem como este estudo.

Os dados da prevalência da leucemia felina encontrados no Brasil apresentam uma grande variação, sendo encontrado uma positividade de 12,6 % de animais infectados com o FeLV, em estudo realizado por Barbosa et al. (2001), 47,5% por Coelho et al. (2008), e 17,4% por Souza et al. (2002). As variações, podem ser explicadas devido a análise de diferentes grupos de animais, pois, os que tem acesso a rua ou vivem em abrigos compõem um grupo de risco, possuindo uma maior probabilidade de se infectar com o vírus (Meinerz et al., 2010).

Outra consideração importante com relação à prevalência da Leucemia felina é o emprego de diferentes métodos diagnósticos (Teixeira et al., Coelho et al., 2008). Sendo que em alguns autores que obtiveram uma alta positividade para o FeLV, utilizaram métodos diagnósticos mais sensíveis (Coelho et al., 2008). O método diagnóstico de triagem dos animais utilizado no presente estudo foi o kit comercial Leucemia e Imunodeficiência felina Ag Test Kit (Alere™), que detecta a presença do anticorpo para os vírus, sendo este o método utilizado na rotina da clínica veterinária, porém, apresenta algumas limitações, como ser incapaz de detectar animais com infecção latente.

O teste de ELISA busca detectar a proteína de capsídeo 27kDa (p27), no soro ou plasma, onde pode ser encontrada em grande quantidade, sendo este um bom marcador para diagnóstico da infecção, o teste pode ainda ser utilizado para triagem, uma vez que detecta animais positivos já na quarta semana de infecção (Lutz et al., 1983; Jarret et al. 1982; Flynn et al., 2002; Levy et al., 2008; Lutz et al., 2009).

O teste de imunofluorescência indireta (IFA) se baseia em identificar componentes do gene *gag* em granulócitos, linfócitos e plaquetas a partir do esfregaço sanguíneo de animais infectados (Hardy et al., 1973).

Isolar o vírus em cultivo celular é considerado o teste definitivo, porém não é utilizado na rotina clínica uma vez que apresenta uma alta complexidade para a sua realização (Lutz et al., 2009).

#### **5.4 Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos observados ao exame clínico foram: Halitose, salivação intensa, gengivoestomatite, faringite, sangramento oral, ulcerações em porção dorsal e lateral da língua, lesões em arco glossopalatino, caquexia, letargia, diarreia e animais

que apresentavam co-infecções (sinais respiratórios) por outras doenças, devido à imunossupressão (figura 11). Os sinais clínicos da leucemia felina se manifestam apenas em animais com infecção persistente, podendo ocorrer em animais de todas as idades (Lutz et al., 2009), estes sinais normalmente são causados devido às infecções secundárias que se instalam mais facilmente devido a imunossupressão causada pelo FeLV (Levy et al., 2008; Hosie et al., 2009; Hartmann., 2011), devido a isto, os sinais clínicos apresentam uma grande variação dependendo da idade do animal no momento em que houve a exposição, eficácia da resposta do sistema imune, da exposição e possível co-infecção por outros agentes patogênicos, e do subtipo que resultou na infecção do FeLV (Hosie et al., 2009; Lutz et al., 2009; Hartmann, 2011).

Figura 11. Recinto coletivo de felinos em abrigo para animais.



Fonte: Albuquerque, 2017

Segundo Lutz et al (2009) o FeLV pode provocar diversas doenças, sendo a maioria potencialmente fatal, tendo como as mais comuns os linfomas (linfossarcomas), leucemia mielóides e linfóides, anemia, imunossupressão, enterite, supressão de medula óssea e desordens reprodutivas).

Animais infectados pelo FeLV apresentam diversos tipos de anemia, sendo a anemia não-regenerativa a mais comum. As anemias regenerativas são mais raras sendo causadas principalmente pelas infecções secundárias ou a processos imunomediados. Devido a mielossupressão causada pelo vírus, há um impedimento da diferenciação dos precursores dos eritrócitos na medula óssea, levando a uma anemia macrocítica (Kociba, 1986; Quingley et al., 2000). Animais mais jovens são mais suscetíveis à infecção, apresentando uma maior predisposição a desenvolver doenças FeLV

relacionadas, como linfomas, doenças mieloproliferativas ou mielossupressivas e imunodepressão (Hagiwara et al., 1997). Um dos animais estudados apresentava enterite crônica, e algumas doenças associadas, como a Rinotraqueíte Herpética felina, o animal em questão poderia apresentar um estado de imunossupressão, tendo em vista que a leucemia felina é uma doença complexa que pode causar uma sintomatologia muito variada, dependendo da resposta imune do hospedeiro.

A reduzida quantidade de amostras positivas para o FeLV não permitiram que fossem avaliados os valores hematimétricos para verificar possíveis diferenças de animais positivos e negativos.

## 6. Conclusões

- Neste trabalho foram detectados quatro animais infectados com o vírus da leucemia felina, obtendo-se uma frequência de 8% de animais positivos;
- Nem um dos animais estudados possuíam co-infecção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV)
- Os principais sinais clínicos apresentados foram halitose, salivação intensa, gengivoestomatite, faringite, sangramento oral, ulcerações em porção dorsal e lateral da língua, lesões em arco glossopalatino, caquexia, letargia, diarreia e animais que apresentavam co-infecções (sinais respiratórios) por outras doenças, devido à imunossupressão
- O estudo obteve êxito ao padronizar e otimizar as reações de PCR para o gene *gag*.
- A reduzida quantidade de amostras positivas para o FeLV não permitiram que fossem avaliados os valores hematimétricos para verificar possíveis diferenças de animais positivos e negativos.

## Referências

AMORIM DA COSTA, F.V.; NORSWORTHY, G. D. Feline leukemia vírus diseases. *In: NORSWORTHY, G. D. (Ed.). The Feline Patient*. 4<sup>th</sup> ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 184-186.

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

ARJONA, A. et al. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J. Feline Medicine and Surgery*, n.9, p.14-22, 2007.

BANDECCHI, P.; DELL'OMODARME, M.; MAGI, M.; *et al.* Feline leukaemia vírus (FeLV) and feline immunodeficiency vírus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Vet. Rec.*, v. 158, p. 555-557, 2006.

BARR, F. (1998). Feline Leukemia virus. *Journal of small practice*, 39, 41-43.

BARBOSA, F.C. et al. Prevalência da leucemia felina em gatos domésticos de Uberlândia – MG. *Arquivo ciência veterinária e zoologia*. UNIPAR, v.5, n.2, p.207-211, 2001.

BELAK, S., HOSIE, M., & ADDIE, D. (2009). Feline immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine Surgery*, 11, 575.

BIRCHARD, S. J., & SHERDING, R. G. (2006). *Saunders Manual of Small Animal Practice* (3<sup>a</sup> Edição ed.). St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVI, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BISSET LR, L. H. (2002). Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. *Antiviral Res*, 53, 35.

BORETTI, F., OSSENT, P., BAUER-PHAM, K., WEIBEL, B., MEILI, T., CATTORI, V., HOFMANN-LEHMANN, R. (2004). Recurrence of feline leukemia virus (FeLV) and development of fatal lymphoma concurrent with feline immunodeficiency virus (FIV) induced immune suppression. 7<sup>o</sup>International Feline Retrovirus Research Symposium. Pisa, Italy.

BRALEY, J. FELV & FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. **Feline Practice**, v.22, n.2, p.25-28. 1994.

COELHO, F. M. Ocorrência do DNA proviral do vírus da leucemia felina em *Felis catus* detectado por Nested-PCR. 2003. 99 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

COELHO, F.M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of General Virology*, v.89, p.2799-2805, 2008.

COELHO, F. M. et al. Occurrence of feline leukemia virus in *Felis catus* in Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n. 3, p. 778-783. 2011.

COFFIN, J., HUGES, S., & VARMUS, H. (1997). *Oncogenesis*. USA: Cold spring Harbor Laboratory press.

COHN, L. A. Update on feline retroviral infections. *In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF COMPANION ANIMAL VETERINARIANS, 2006, Rimini. Proceedings...Rimini: ITALIAN ASSOCIATION OF COMPANION ANIMAL VETERINARIANS, 2006. P. 22-23.*

COSTA, U. M.; REISCHAK, D.; SCHMITT, A. C.; RENCK, L.; OLIVEIRA, E. S.; FERREIRO, L. Detection of feline leukemia virus (FeLV) antigen from 1992 to June 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Virus Reviews & Research**, v. 5, p. 94, 2000.



COTTER, S.M. Feline viral neoplasia. *In* Greene, C. E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**, 2<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 71-84.

COUTO, C.G. Diagnóstico e tratamento de doenças retrovirais em gatos. *In*: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro, 1994. cap.91. p.702-705.

DUARTE, A., CASTRO, I., FONSECA, I., ALMEIDA, V., CARVALHO, L., MEIRELES, J., FAZENDEIRO, M., TAVARES, L., VAZ, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 441-446.

DUNHAM, S., & GRAHAM, E. (2008). Retroviral infections of small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38, 879-901

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 4 ed. São Paulo: Manole, 1995, .589-06.

FINOKETTI, Fernando. Ocorrência dos vírus da Imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre. 2011. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Ufrgs, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/142816>>. Acesso em: 10 janeiro. 2017.

FUJINO, Y., OHNO, K., & TSUJIMOTO, H. (2008). Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123, 138.

GIL, S., LEAL, R., DUARTE, A., MCGAHIE, D., SEPÚLVEDA, N., SIBORRO, I., TAVARES, L. (2013). Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. *Research in veterinary science*, 94, 753-763.

GLEICH, S., KRIEGER, S., & HARTMANN, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 985.

GOMES-KELLER, M., GONCZI, E., & TANDON, R. (2006). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 916-922.

GÓMEZ, N., FONTANALS, A., CASTILLO, V., GISBERT, M., SURANITI, A., MIRA, G., & PISANO, P. (2012). Evaluation of different antiretroviral drug protocols on naturally infected feline immunodeficiency virus (FIV) cats in the late phase of the asymptomatic stage of infection. *Viruses*, 4, 924-939.

GWYNN, S., HANKENSON, F., LAURING, A., ROHN, J., & OVERBAUGH, J. (2000). Feline leukemia virus envelope sequences that affect T-cell tropism and syncytium formation are not part of known receptor-binding domains. *Journal of Virology*, 74, 5754-5761.

HAGWARA, M. K.; RECHE JR., A.; LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 35-38. 1997.

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

HARDY, W.D. et al. Horizontal transmission of feline leukemia virus. **Nature**, v.244, p.266-269, 1973.

HARDY, W. D. JR. *et al.* Biology of feline leukemia virus in the natural environment. **Cancer research**, Baltimore, v. 36, n. 2, p.582-588, Feb. 1976.

HARTMANN, K. (2006). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (3ª Edição ed.). USA: Saunders Elsevier.

HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. *In:GREENE, C. E. (Ed.). Infectious disease of dog and cat*. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Elsevier. 2012. p. 108-136.

HARTMANN, K., WERNER, R.M., EGBERINK, H., *et al.* 2001. Comparison of six-in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet rec* 149:317-320.

HARVEY, J., W. (2012). *Veterinary Hematology A Diagnostic Guide and Color Atlas.*(1Ed),Elsevier Saunders inc. Pág 18.

HAWKS, D., LEGENDRE, A., & ROHRBACH, B. (1991). Comparison of four test kits for feline leukemia virus antigen. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199, 1373-1377

HAYES, K., ROJKO, J., & MATHES, L. (1992). Incidence of localized feline leukemia virus infection in cats. *American journal of veterinary research*, 53, 604-607.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 446 p.

HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M. *et al.* Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, v.30, p.113-123, 1992.

HOFMANN-LEHMANN, R. *et al.* How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, Amsterdam, v. 123, n. 1-2, p. 119-123, May 2008.

HOOVER, E.A. *et al.* Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bonemarrow, and saliva of cats. ***Cancer Research***, v.37, p.3707-3710, 1977.

HOOVER EA, MULLINS JI. 1991. Feline leukemia virus infection and diseases.*J Am Vet Med Assoc*199:1287-1297

HOSIE, M., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., HORZINEK, M. (2009). ABCD guidelines on feline immunodeficiency virus. ***Journal of Feline Medicine and Surgery***, 11, 575-584.

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

HUITRON-RESENDIZ, S., DE ROZIERES, S., & SANCHEZ-ALAVEZ, M. (2004). Resolution and prevention of feline immunodeficiency virus induced neurological deficits by treatment with the protease inhibitor TL-3. *Journal of Virology*, 78, 4525.

JACKSON, M. L., HAINES, D. M., MERIC, S. M. & MISRA, V. (1993). Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57,269±276.

JARRET, W. F. H. et al. A virus-like particle associated with leukemia (pymphosarcoma). *Nature*, v. 202, p. 567-569. 1964.

JARRETT, O. et al. Interaction between feline leukaemia virus subgroups in the pathogenesis of erythroid hypoplasia. *International Journal of Cancer*, v.34 p.283-288, 1984.

JARRETT, O., & HOSIE, M. (2004). Feline leukaemia virus infection. In E. Chandler, C. Gaskell, & R. Gaskell, *The Feline Medicine and Therapeutics* (pp. 597-607). USA: Blackwell Publishing.

KOCIBA, G. (1986). Hematologic consequences of feline leukaemia virus infection. In R. Kirk, *Current Veterinary Therapy*. (p. 448). USA: WB Saunders.

LAFRADO, L., LEWIS, M., & MATHES, L. (1987). Suppression of in vitro neutrophil function by feline leukaemia virus (FeLV) and purified FeLV-p15E. *Journal of General Virology*, 68, 507.

LAIRMORE, M. D. (2011). *Fenner's Veterinary Virology* (4<sup>a</sup> ed.). San Diego, USA: Elsevier

LAPPIN, M. R. Feline leukemia virus. In: *Seminário internacional de doenças infecciosas*. Anais. São Paulo: 1998, p.36-44.

LEE, C., & REDDY, E. P. (1999). The v-myc oncogene. *Oncogene*, 18, 2997-3003

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

LEVY, J. Crawford, C., Hartmann, K., Little, S., Sundahk, E., Thayer, V., & Hoffmann-Lehmann, R. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 10, n. 3, p. 300-316, July (2008a).

LEVY, J., CRAWFORD, P., KUSUHARA, H., MOTOKAWA, K., GEMMA, T., WATANABE, R., HOHDATSU, T. (2008B). Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, 22, 330-334.

LITTLE, S. *et al.* Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 52, n. , p. 846-855, Aug. 2011.

LOAR, A.S. Feline Leukemia virus-immunization and prevention. **Vet. Clin. North Am: Small animal practice.** v. 23, n. 1. p. 193-2, 1993

LORENTZEN, L., & LEVY, J. (2006). Long-term outcome of cats with natural FeLV and FIV infection. 8th International Feline Retrovirus Research Symposium. Washington, USA.

LUCIW, P. A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds.). Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. P.1881-1952.

LUTZ, H. *et al.* Feline Leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, p.565-574, 2009. Disponível em: <<http://www.abcd-vets.org>>. Acesso em: 30 jul. 2016. doi:10.1016/j.jfms.2009.05.005.

MALIK, R., KENDALL, K., CRIDLAND, J., *et al.* Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. *Aust. Vet. J.*, v. 5, p. 323-327, 1997.

MARTINS, N. S.; RODRIGUES, A.; GONÇASVES, S.; SILVA, A.; OLIVEIRA, R.; REIS, J.; MELO, F. Occurrence of Feline Immunodeficiency Vírus (FIV) and Feline Leukemia (FeLV) in São Luís - MA. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 2015. DOI: 103844.

MARUYAMA, S., KABEYA, H., NAKAO, R., *et al.* Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infection in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.*, v. 47, p. 147-153, 2003.

MEHL, M. L. Feline leukemia virus. IN: LAPPIN, M. R. *Feline Internal Medicine Secrets*. Philadelphia: Hanley & Belfus. cap.76, 2001, p.387-391.

MEINERZ, A.R.M. *et al.* Frequência do vírus da leucemia felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90-93, 2010.

MERCK. Feline leukemia vírus and related disease: introduction. IN: *The Merck Veterinary Manual*. Estados Unidos, 2006. Disponível em: <<http://vetmanual.com/mvm/index.jsp>>. Acesso em: 13 janeiro 2017.

MENDOZA, R. *et al.* A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. *Journal of Virology*, v.80, p.3378-3385, 2006. Disponível em: <<http://www.jvi.asm.org>>. Acesso em: 27 dezembro 2016. doi:10.1128/JVI.80.7.3378-3385.2006

MEHROTRA, S., MISHRA, K., & YADAV, V. (2003). Immunomodulation by peptide analogs of retroviral envelope protein. *Peptides*, 24, 979.

MIYAZAWA, T. (2002). Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*, 7, 504-518.

MOCHIZUKI, H., TAKAHASHI, M., NISHIGAKI, K., IDE, T., GOTO-KOSHINO, Y., WATANABE, S., TSUJIMOTO, H. (2011). Establishment of a novel feline leukemia virus (FeLV)-negative B-cell cell line from a cat with B-cell lymphoma. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 140, 307-311.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 001, p.1016-1022.

NORSWORTHY, G. (1993). *Feline Practice*. USA: J. B. Lippincott Company

NORSWORTHY, G. D. Feline leukemia virus diseases. IN: NORSWORTHY, G. D. *The Feline Patient: essentials of diagnosis and treatment*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 1998. cap.55, p.204-209.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C.R.M. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*, v.292,p.1106-1109, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 23 janeiro, 2017. doi: 10.1126/science.105912.

PACITTI, A. M.; JARRET, O.; HAY, D. Transmission of feline leukemia virus in the milk of a non-viremic cat. **Veterinary Record**, London, v. 118, n.14, p. 381-384. Apr. 1986.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, 332 p., Springer, 2008.

PEREIRA, J.M. & TAVARES, L. (2002). In V.F.C. Ferreira & J.C.F. de Sousa (Eds.) *Microbiologia*, vol. 3, 275-313. Lisboa, Portugal: Lidel

PHILLIPS, K., ARAI, M., & TANABE, T. (2005). FIV-infected cats respond to short-term rHuG-CSF treatment which results in anti-G-CSF neutralizing antibody production that inactivates drug activity,. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 108, 357

PINCHES, M., DIESEL, G., HELPS, C., TASKER, S., EGAN, K., & GRUFFYDD-JONES, T. (2007). An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. *Veterinary Clinical Pathology*., 36, 141-147.

PONTIER, D.; FROMONT, E.; COURCHAMP, F.; ARTOIS, M.; YOCCOZ, G. Retroviruses and sexual size dimorphism in domestic cats (*Felis catus*). **Proceedings of the Royal Biological Society**, v. 265, p. 167-173, 1998.

QUIGLEY, J., BURNS, C., ANDERSON, M., LYNCH, E., SABO, K., OVERBAUGH, J., & ABKOWITZ, J. (2000). Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*, 95, 1093-1099.

RAVAZZOLLO, A. P., & COSTA, U. (2007). Retroviridae. *Retroviridae*, 809-838.

RICHARDS, J. (2005). Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management. *Biologicals*, 33, 215-217.

RODRIGUES, C. (2012). Prevalência de Vírus da Imunodeficiência Felina, Vírus da Leucemia Felina, Calicivírus Felino, Herpesvírus Felino Tipo I e *Candida spp* em Felinos Errantes e possível 61 associação a Gengivo-estomatite Felina e Doença Respiratória Felina. Lisboa: Tese de mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

ROJKO, J.L. et al. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v.63, p.759-768, 1979.

ROJKO, J. L.; HARDY, W. D. Feline leukemia virus and other retroviruses. IN: SHERDING, R. G. *The Cat: Diseases and Clinical Management*. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994, cap.11, p.263-432.

ROSADO, R. (2009). Rastreio virológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral. Lisboa: Tese de mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa

RYPUŁA, K., PŁONECZKA-JANECZKO, K., BIEROWIEC, K., KUMALA, A., & SAPIKOWSKI, G. (2014). Prevalence of viral infections in cats in southwestern Poland in the years 2006 to 2010. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 127, 163-165.

SCHMELTZER, L. Preventive Health programs. *In: SCHMELTZER, L.; NORSWORTHY, G. D. (Ed.). Nursing the feline patient*. Chicester: Wiley-blackwell, 2012a. p. 18-20.

SCHMELTZER, L. Feline leukemia virus diseases. *In: SCHMELTZER, L.; NORSWORTHY, G. D. (Ed.). Nursing the feline patient*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012b. p. 189-194.

SELLON, R., & HARTMANN, K. (2006). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. (3ª Edição ed.). USA: Greene, C.E



SHELTON, G., GRANT, C., & LINENBERGER, M. (1990). Severe neutropenia associated with griseofulvin therapy in cats with feline immunodeficiency virus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4, 317.

SHERDING, R. G. Vírus da leucemia felina. *In*: BICHARD, S. J.; SHERDING, R.G. (Ed.). **Manual Saunders clínica de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 117-127.

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

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

SPARKES, A. (2003). Feline leukaemia virus and vaccination. *Journal of feline medicine and surgery*, 5, 97-100.

SPARKES, A.; PAPASOULIOTIS, K. Feline retrovirus infections. *In*: DAY, M. J.; KOHN, B. (Ed.). **BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. 2<sup>nd</sup> ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2012. p. 149-157.

STÜTZER, B. *et al.* Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrance, v. 24, n. 1, p. 192-197, Jan-Feb. 2010.

STÜTZER, B., SIMON, K., LUTZ, H., MAJZOUB, M., HERMANN, W., HIRSCHBERGER, J., HARTMANN, K. (2011). Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *Journal of Feline Medicine Surgery*, 13, 81-87.

TANDON, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A.C. et al. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Res.*, v.135, p.136-143, 2008.

TEIXEIRA, B.M., D.S. RAJÃO, J.P.A. HADDAD, R.C. Leite and J.K.P. Reis et al., 2007. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, 59: 939-942. DOI: 10.1590/S0102-09352007000400019.

TEIXEIRA, C. H. R.; SOUZA, H. J. M. Manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina. *In*: SOUZA, H. J. M. (Ed.). *Coletâneas em medicina e cirurgia felina*. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2003a. p. 301-313.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

TORRES, A. N., MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, New York, v. 332, n.1, p. 272-283, Feb. 2005.

UTHMAN, A. *et al.* Detection of sequences of feline leukemia virus in chronically inflamed oral tissue of FeLV-non-viremic cats by using polymerase chain reaction. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, Wien, v. 83, . 7, p. 195-198, 1996.

WESTMAN, M.E; PAUL, A.; MALIK, R.; McDONAGH, P.; WARD, M.P.; HALL, E.; NORRIS, J.M. **Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013)**. **Journal of feline medicine and surgery**, vol. 2, n.1, 2016.

WHITNEY, C. Feline leukemia virus. **Veterinary Technician**. USA, v.24, n.2, 2003, p.102-109.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *The Veterinary journal*, London, v. 195, n. 1, p. 16-23, Jan. 2013.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, n.1, p.69-70, 2000.

## Apêndice

### Ficha de Identificação

#### Dados do responsável pelo felino

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Clínica Veterinária: \_\_\_\_\_

Veterinário responsável: \_\_\_\_\_

#### Dados do Animal

1) Nome do animal: \_\_\_\_\_

2) Sexo: \_\_\_\_\_

3) Idade: \_\_\_\_\_

4) Raça: \_\_\_\_\_

5) Origem (Procedência):  Nascido em domicílio;  Gatil;

Pet shop;  Encontrou na rua;  Não relatada

6) Ambiente onde vive:  casa;  apartamento;  rua;

abrigo de animais

7) Convive com outros gatos em domicílio/abrigo? Quantos? \_\_\_\_\_

8) Estado de higidez dos contactantes  sadio  doente

9) Tem acesso à rua?  sim  não

10) Vida reprodutiva:  castrado  não castrado

11) É vacinado?  sim  não Quais? \_\_\_\_\_

12) Sintomatologia clínica: \_\_\_\_\_

13) Já fez transfusão sanguínea?  sim  não

14) Está sendo medicado?  sim  não \_\_\_\_\_

15) Histórico de doenças anteriores: \_\_\_\_\_

16) Observações: \_\_\_\_\_

17) Data: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_