

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Fernando Araújo Protzner de Oliveira

**DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) A
PARTIR DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.**

Belo Horizonte
2025

Fernando Araújo Protzner de Oliveira

**DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) A
PARTIR DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
2025

O48d

Oliveira, Fernando Araújo Protzner de ,1989-

Diagnóstico de infecção pelo vírus da Leucemia felina (felv) partir de Elisa indireto utilizando peptídeos sintéticos/Fernando Araújo Protzner de Oliveira.- 2025.

84 f. il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Bibliografia f. 69 a 81.

1. Gatos - Doenças - Diagnóstico - Teses - 2. Linfoma - Teses - 3. Leucemia felina - Teses - I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDO ARAÚJO PROTZNER DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em **CIÊNCIA ANIMAL**, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada: "**DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) A PARTIR DE ELISA INDIRETO UTILIZANDO PEPTÍDEO SINTÉTICO.**"

Aprovado(a) em 28 de fevereiro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis - Orientador(a)

Dr.(a). Fabiana Alves

Dr.(a). Cláudia Fideles Resende



Documento assinado eletronicamente por Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Presidente de comitê, em 28/02/2025, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cláudia Fideles Resende, Usuária Externa, em 12/03/2025, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabiana Alves, Usuária Externa, em 13/03/2025, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3999476 e o código CRC 41673A48.

Aos meus pais Pedro Augusto e Núbia e à minha irmã Fabíola, os Protzner's, juntos sempre somos mais fortes e iremos longe. O apoio familiar incondicional é a maior força que temos. Vocês três me inspiraram e me guiam ao sucesso.

Agradecimentos

A Deus pai misericordioso pela vida, pelo acordar, por me proporcionar experiências de crescimento, aprendizado e por essa oportunidade de fazer o mestrado, e alcançar meu grande objetivo de vida que é ser professor.

A São Francisco de Assis por guiar minha mente e minhas mãos na clínica, e agora na pesquisa, para que possa proporcionar o melhor tratamento e obter o melhor diagnóstico para os animais que tanto sofrem.

A todos meus santos de devoção, Nossa Senhora Aparecida, Santa Rita de Cássia, Nossa Senhora de Fátima e Nossa Senhora da Boa Viagem pela força nos momentos difíceis, desafiadores e por me acompanharem nas estradas da vida.

A meus pais Pedro Augusto Protzner de Oliveira e Núbia Araújo Protzner de Oliveira por sempre estarem ao meu lado, me escutando, me aconselhando, me acalmando e dando força para continuar a minha jornada que muitas vezes foi difícil nesses dois anos. E principalmente por sempre comemorarem e se emocionarem com cada conquista minha, cada sucesso meu. Vocês sempre serão a minha base e minha inspiração de luta e perseverança.

A minha irmã Fabíola Araújo Protzner de Oliveira, por ser uma inspiração para mim, por me mostrar caminhos novos, por trazer uma melhor visão de mundo e principalmente por me estimular a defender meu ponto de vista e minhas necessidades como ser humano.

Ao Guilherme Santos Freitas, meu cunhado, que entrou em nossa família há 5 anos, “Agora temos um psicólogo na família – Tia Cecília”, pelo apoio e carinho. Sua força de vontade e empenho em alcançar seus objetivos, figurados na luta para vir para aqui perto, me inspiraram a lutar pelos meus sonhos.

Aos meus Tios Cecília Protzner Lopes (*in memorian*) e Raul Lopes Muradas (*in memorian*) e a minha avó Daisy Protzner de Oliveira por tudo em minha vida! Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigado por cuidarem de mim aí do céu.

Ao professor Jenner pela orientação, oportunidade, por transmitir um pouco do seu conhecimento, por me direcionar no caminho cheio de curvas, desafiador, da pesquisa e principalmente por me ajudar a realizar meu maior objetivo de ser professor.

Ao Lucas Tadeu meu co-orientador, que para mim é oficial, e grande amigo que fiz nessa caminhada do mestrado. Você foi a grande chave, a base e quem proporcionou um caminho mais confortável e esperançoso durante a pesquisa. Sua visão, modo de passar o conhecimento, modo de discutir os resultados, o relato de suas experiências e suas sugestões para que meu projeto desse mais certo possível tornou tudo mais fácil e tranquilo. Que Deus o abençoe e abençoe sua família.

A Bioclin Quibasa pelo maior e melhor apoio que eu podia ter para trilhar o caminho do mestrado e para alcançar meu objetivo de vida que é ser pesquisador e professor. Obrigado, em especial, ao Mayerson Thompson por tornar essa parceria e, por consequência, a execução do meu projeto possível, nos vemos no caminho da vida.

Ao Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelo apoio, pelas orientações, por compartilharem a experiência na execução de projeto como o meu, pela membrana, pelos preciosos peptídeos e, principalmente, por me receberem tão bem e com tanto carinho, me sinto em casa quando estou aí. Obrigado Professoras Daniella e Érica.

Um agradecimento especial a Vanessa Gomes do Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos do ICB/ UFMG. Você é um anjo. Aprendi muito com você. Sua escuta, seu carinho, seu cuidado comigo para que tudo desse certo, para que eu conseguisse passar pelos momentos difíceis, me ajudaram a trilhar o caminho nesses dois anos de mestrado. Obrigado por tudo. Que Deus te abençoe e ilumine seu caminho.

Ao Laboratório de Imunologia e Controle de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelo apoio na execução de uma das partes mais importantes do meu projeto. A receptividade de vocês, o carinho e a disponibilidade fizeram com que me sentisse acolhido quando estava aí. Obrigado Professor Ricardo Fugiwara e Letícia.

Ao Felipe Álvaro, meu parceiro da equipe FeLV e outro grande amigo do mestrado. Eu me inspiro em você, na sua força de vontade, na sua forma de enfrentar os desafios, destemido, ativo, firme e parece até sem medos... mas sei que tem alguns medos por trás da casca dura. Obrigado por sempre se empenhar na busca por amostras para nós e pelos inúmeros PCR's. Eu tenho certeza do seu grande futuro como Doutor e melhor pesquisador da Biologia molecular do Brasil, dos EUA e do mundo.

A Ana Clara Minardi Castro, minha “frienda” e a melhor **minha IC** de todos os tempos. Sua escuta, seu carinho, sua força e nossa parceria foram indispensáveis na minha caminhada nesses dois anos! Você foi meu anjo da guarda do mestrado. Você é um grande exemplo, e tenho certeza de que será daqui a pouquinho uma das melhores Médicas Veterinárias! Lembre-se Nossa Senhora Aparecida sempre estará junto de pessoas de luz como você, te protegendo e guiando seus passos pelos melhores caminhos.

A Thaís, minha parceira da equipe sorologia, pela amizade, pela companhia de projeto e por tornar meus dias melhores dentro do Lab e da sala de estudos. Você me deixa impressionado com sua inteligência e agilidade em resolver as coisas, por isso, você me inspira. Vejo você voando alto, acredite nisso e em você sempre. Vou aplaudir você daqui!

Aos colegas de RetroLab Valéria, Ana Paula, Bárbara, Aline e Ana Regina, pela convivência e dicas nos seminários.

A Denise, desde a PUC é a pessoa que sempre está ao meu lado para tudo e em todos os momentos. Obrigado pela escuta, pelo carinho, pelo companheirismo e, principalmente, por permitir que meu experimento acontecesse com as amostras que conseguiu. Obrigado clínica Animattus pelo apoio.

A Clínica Veterinária Vetcheck Up pet pelo apoio, dedicação, carinho, parceria e por tornar possível a concretização do meu experimento. Fiquei impressionado, maravilhado e muito agradecido quando soube das 99 amostras em, se não me engano, duas semanas. Muito obrigado mesmo à Vanessa, ao André e a Nathalia, meus anjos nessa fase final do mestrado.

Ao abrigo Albita, pelo apoio, disponibilidade, amostras e por tornar possível a execução do meu projeto.

A Marina Mourão pelo apoio incondicional, por tornar possível a concretização da minha pesquisa (obrigado pelas amostras!) e principalmente por não medir esforços para me ajudar, até mesmo no domingo. Sua escuta, carinho e troca me ajudaram a percorrer esses dois anos de desafios e alegrias.

A Bianca Moreira, pelo carinho, pela escuta e, principalmente, por nos 45 minutos do segundo tempo me fornecer amostras positivas, esperança para os meus resultados no ELISA. Seus estímulos me ajudam muito, quero que saiba disso.

Ao Hospital Veterinário da UFMG, pelo apoio, por me ceder amostras de grande importância para o meu experimento.

Ao Laboratório AQUACEN, pelo apoio e disponibilidade, por sempre me receberem nos momentos de correria, quando a leitora de ELISA lia de forma estranha e quando não estava em funcionamento. Obrigado Júlio por sempre me receber tão bem nesses momentos.

As professoras Érica Azevedo e Maria Isabel Guedes por, a partir do Programa de Capacitação em docência (PCDE) da Pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG, me proporcionar a experiência, que tanto queria ter, a docência e, por aprender com vocês a transmitir da melhor forma o conhecimento. Sinto-me, então, preparado para formar Médicos Veterinários competentes.

Ao professor Rafael Romero Nicolino pelo apoio no estudo dos resultados e sugestões na discussão desses. Muito obrigado pela luz mediante resultados tão intrigantes, pela atenção e por sempre me receber tão bem.

A equipe do CME, em nome da Jaque, por sempre me receberem bem e com carinho. E por sempre se dedicarem a nos fornecer o melhor material, vidraria estéril, para a adequada execução do experimento.

Ao Marília, Toninho, Dercy, André e Wellington, pelo apoio, pelo carinho, pela escuta e conselhos nos momentos difíceis e pela amizade.

A Agda pela escuta, pelo carinho, pelas sugestões para melhorar minha mente nos momentos difíceis. O seu acolhimento trouxe luz nos momentos mais escuros. Que Nossa Senhora te ilumine sempre.

A Anna Gabriella pelo grande carinho e apoio nos momentos difíceis nesses dois anos. Apreendi muito com você sobre a prática laboratorial, o que também contará muito para minha carreira. Você foi um anjo naqueles dias difíceis. Que Nossa Senhora Aparecida te abençoe e proteja!

A Grazi por todos os ensinamentos da rotina laboratorial, você faz isso com maestria! Pelo carinho, pela atenção, pela escuta, pelos conselhos e por ser a cruzeirense mais legal dos Labs da veterinária kkkkk (não podia faltar). Que Deus te abençoe e abençoe sua família sempre.

Ao Guedes meu grande parceiro da Escola de Veterinária da UFMG nesses dois anos. Quantas conversas e quantas situações difíceis andamos compartilhando né! Mas tenho certeza de que foi assim, pois nosso momento de vitórias estão chegando. Que Deus ilumine sua jornada.

Aos funcionários dos serviços gerais e da manutenção geral, Sr Edson, Luiz (manutenção dos freezer's e geladeiras) e Meire por tornar possível o funcionamento do prédio da Escola de veterinária e, por consequência, os laboratórios e a execução dos experimentos.

Ao Victor, a Thay e ao Prof. Rodrigo, pelo carinho, pela escuta e pela amizade nesses dois anos de mestrado. Vocês foram fundamentais em todos os momentos.

Aos amigos João Paulo (PROTOVET), João Victor (UFLA), Angela (LPVA), Letícia (desde a PUC) (LABAVES), Beatriz (LPVA), Brenda (LPVA), Renata (LPVA), Bruna Sampaio (LPVA), Maria Clara (LPVA) e Nagila (LPVA), pelos excelentes momentos que vivemos nos corredores, nas aulas e na sala E201. Pelas conversas e por todo o carinho.

A Victoria (LABAVES), pelo carinho, escuta e pelo apoio na execução do meu experimento (amostra da PUDIM). Você me inspira ao ver sua seriedade e dedicação nos seus projetos do mestrado e doutorado, você vai longe e será uma excelente professora.

Aos meus psicólogos Luiz e agora Daniel, e a minha psiquiatra Dra. Débora pelo apoio, escuta e direcionamento nessa caminhada difícil e desafiadora que é o mestrado. Sem vocês, principalmente nos últimos 8 meses eu não teria terminado esse ciclo, e consequentemente, não teria conquistado meu sonho de ser professor.

A Marlene pela escuta, carinho e apoio de sempre. AAAAA e pelos quitutes deliciosos que tornaram esses dois anos mais saborosos e fáceis de viver.

*“Nothing really matters 'til you start
Things you do will define who you are
Wise men try to understand
And not to judge their fellow man at all
Just try.*

*Open your heart
Be the change that you want for this world
Look in the mirror
Open your heart
Let the seeds that you sow be the future
Here in the now!”*

Here in the Now – Angra

Música: M. Barbosa, F. Lione, F. Andreoli,
R. Bittencourt e B. Valverde.

Letra: R. Bittencourt, F. Lione e D. Ward

Resumo

A leucemia felina, doença infecciosa que afeta gatos e felinos selvagens em todo mundo, apresenta diagnóstico desafiador devido a complexidade de sua patogênese. O controle do vírus causador da doença, o vírus da leucemia felina (FeLV), que pertence a família *Retroviridae*, se estabelece a partir da identificação de animais infectados e de sua segregação. Na rotina a detecção da infecção pelo vírus é feita principalmente pela proteína p27 a partir de teste imunocromatográfico, porém este é capaz de detectar apenas animais no curso mais grave da doença, o curso progressivo. Mesmo empregando um teste mais sensível, a *polymerase chain reaction* (PCR), de forma associada, ainda se vê a necessidade de se desenvolver um novo método diagnóstico para detectar, de forma mais adequada, a infecção pelo vírus em todos os cursos (abortivo, regressivo, progressivo). Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um ELISA indireto utilizando peptídeos sintéticos, selecionados a partir da técnica de *Spot Synthesis*, sendo essa uma alternativa para auxiliar no diagnóstico da leucemia felina. Para tanto, foram empregadas técnicas inovadoras que envolvem o uso da biotecnologia. O *Spot Synthesis* é uma metodologia que a partir da síntese de peptídeos em membrana de celulose é possível a caracterização e o mapeamento de epítomos imunodominantes. Associada a essa técnica, o emprego de programas de computador (Image J e Microsoft Excel) permite a seleção de peptídeos mais imunogênicos, a serem utilizados como antígeno em um ELISA indireto. Neste estudo, foram selecionados 31 peptídeos, e destes apenas 9 (F1 a F9) foram escolhidos para serem sintetizados na forma solúvel. A melhor leitura do ELISA, em padronização, foi obtida a partir dos peptídeos F5 e F6, que correspondem a proteína p30 codificada pelo gene *gag* do FeLV. Ao realizar a validação deste ELISA indireto, a leitura de densidade óptica (DO) revelou uma resposta heterogênea, mostrando também uma não diferenciação entre amostras positivas e negativas em testes de referência. Porém, estes resultados ainda inspiram maior investigação, tendo em vista, também, o comportamento apresentado neste ELISA em relação aos *outlier's*. Os *outlier's* são caracterizados, nesse estudo, como amostras com valores de DO discrepantes entre 0,240 e 0,950. Mediante os resultados apresentados, os quais se mostraram promissores, é incentivada a continuidade do estudo, para aprimorar ainda mais o diagnóstico em desenvolvimento e, por consequência, a detecção da infecção por FeLV.

Palavras chave: Gatos, *Spot synthesis*, Leucemia viral felina, Epítomos, ELISA indireto peptídeo sintético.

Abstract

Feline leukemia, an infectious disease that affects cats and wild felines worldwide, presents a challenging diagnosis due to the complexity of its pathogenesis. The control of infection of the causative virus, feline leukemia virus (FeLV), which belongs to the *Retroviridae* family, is based on the identification and segregation of infected animals. In routine practice, virus detection is primarily performed through the p27 protein using an immunochromatographic test. However, this test can only detect animals in the most severe stage of the disease, the progressive course. Even when employing a more sensitive test, polymerase chain reaction (PCR), in combination, there is still a need to develop a new diagnostic method to accurately detect viral infection in all courses (abortive, regressive, and progressive). In this regard, the present study aims to develop an indirect ELISA using synthetic peptides, selected through the Spot Synthesis technique, as an alternative to assist in the diagnosis of feline leukemia. To achieve this, innovative techniques involving biotechnology were employed. Spot Synthesis is

a methodology that enables the characterization and mapping of epitopes through peptide synthesis on a cellulose membrane. Combined with this technique, the use of computer programs (ImageJ and Microsoft Excel) allows for the selection of the most immunogenic peptides to be used as antigens in an indirect ELISA. In this study, 31 peptides were selected, of which only 9 (F1 to F9) were chosen for synthesis. The best ELISA standardization readings were obtained with the peptides F5 and F6, which correspond to the p30 protein, encoded by the *gag* gene of FeLV . During the validation of this indirect ELISA, the optical density (OD) readings revealed a heterogeneous response, also showing an inability to differentiate between positive and negative samples in reference tests. However, these results still encourage further investigation, considering, in addition, the behavior of outliers in this ELISA. Outliers, in this study, were characterized as samples with discrepant OD values ranging from 0.240 to 0.950. Given the promising results obtained, further studies are encouraged to enhance the diagnostic method under development and, consequently, improve disease detection.

Keywords: Cats, Spot Synthesis, Feline Leukemia Virus, Epitopes, Indirect ELISA, Synthetic Peptide.

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura viral do FeLV.....	20
Figura 2 – Percurso do FeLV pelo organismo de um animal infectado.....	23
Figura 3: Classificação dos possíveis cursos do FeLV. Adaptado do <i>Guideline “Feline Leukaemia virus infection – ABCD recommendations and review of the literature”</i> das autoras Regina Hofmann-Lehmann e Katrin Hartmann, 2021.	25
Figura 4 - Indicações de quando realizar o teste para detecção do antígeno p27.....	30
Figura 5 – Indicações de quando utilizar a PCR para DNA proviral na triagem do FeLV.....	31
Figura 6: Membrana de celulose sintetizada sensibilizada com <i>pool</i> de soros negativos e positivos (<i>spot Synthesis</i>).....	45
Figura 7- Imagem dos <i>spots</i> em escala de cores 1ª sensibilização da membrana.....	48
Figura 8 – Imagem dos <i>spots</i> em escala de cores 2ª sensibilização da membrana.....	53
Figura 9 – Sequencia de aminoácidos correspondente ao gene <i>gag</i> (capsídeo) do FeLV (acesso Genbank: AAA 43055.1).....	58

Lista de tabelas

Tabela 1- Prevalência do FeLV no Brasil.....	18
Tabela 2 – Caracterização dos testes diagnósticos diretos utilizados para detectar o vírus do FeLV em possíveis hospedeiros (Adaptado de Katrin Hartmann and Regina Hofmann-Lehmann, 2020)...	29
Tabela 3 – Valores de densitometria obtidos a partir do tratamento, utilizando o programa <i>Image J</i> , da imagem fotodocumentada após o mapeamento de epítomos e os ensaios imunológicos.	46
Tabela 4 – Peptídeos selecionados a partir de um <i>cutoff</i> (<i>cutoff</i> = 9934,382) estabelecido tendo como base os valores de densitometria obtidos a partir do tratamento da fotodocumentação dos resultados dos ensaios imunológicos.....	49
Tabela 5 - Valores de densitometria obtidos a partir do tratamento, utilizando o programa <i>Image J</i> , da imagem fotodocumentada após o mapeamento de epítomos e os ensaios imunológicos.....	51
Tabela 6 - Peptídeos selecionados a partir de um <i>cutoff</i> (<i>cutoff</i> = 16561) tendo como base os valores de densitometria obtidos a partir do tratamento da fotodocumentação dos resultados dos ensaios imunológicos.....	54
Tabela 7 – Relação de peptídeos selecionados que pertencem ao gene <i>env</i> e ao gene <i>gag</i> do FeLV, mostrando os mais imunodominantes.....	55
Tabela 8 – Peptídeos escolhidos para síntese solúvel.....	57
Tabela 9 <i>Outlier's</i> do ELISA pp30. <i>Outlines</i> F5 (A). <i>Outlines</i> F6 (B). Valores discrepantes de DO.....	61

Tabela 10 – Resultado do ELISA indireto pp30 (valores de DO) dos peptídeos F5 e F6 de animais vacinados. Em destaque os *outlier's*.....

Lista de gráficos

Gráfico 1 – ELISA pp30 F5.....	59
Gráfico 2 – ELISA pp30 F6.....	60

Lista de quadros

Quadro 1 - Descrição das proteínas codificadas pelas regiões gênicas do genoma do FeLV	20
Quadro 2 - - Classificação da fase de infecção das amostras de acordo com os resultados do teste imunocromatográfico e nPCR (proviral).....	39
Quadro 3 – cálculo do <i>cutoff</i> para seleção de peptídeos imunodominantes.....	41
Quadro 4 – Cálculo para normatização de valores de absorbância obtidos no ELISA indireto para FeLV.....	44
Quadro 5 – Fórmula para cálculo de <i>outlier's</i>	60

Lista de abreviaturas

AAFP	American Association of Feline Practitioners
ABCD	European Advisory Board on Cat Diseases
BSA	Soroalbumina bovina
C	Celsius
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
env	Gene que codifica proteínas do envelope dos retrovírus
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
FMOC	Fluorenil- metil-oxicarbonila
gag	Group associated antigen – gene viral que codifica as proteínas estruturais internas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICB	Instituto de ciências biológicas da UFMG
IFA	Immunofluorescence assay

IgG	Imunoglobulina G
LTC	Linfocito T citotóxico
LTR	Long Terminal Repeats
μL	Microlitro
Mg	Miligrama
μg	Micrograma
n PCR	Nested polymerase chain reaction
OPD	O- Phenylenediamine dihydrochloride
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction
PCR	Reação em cadeia de polimerase
POC	Point of care test
pol	Polymerase – gene que codifica as enzimas virais dos retrovírus
RNA	Ácido ribonucleico
RT - PCR	Transcriptase reversa – Polymerase chain reaction
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TI	Teste imunocromatográfico
TIPS	Tri-isopropilsilano
Tween-20	Tensoativo hidrofílico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
well	poço

Sumário

1. Introdução	16
2. Objetivo.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3. Revisão de literatura	17
3.1 Histórico do FeLV	17
3.2 Etiologia	19
3.3 Transmissão	21
3.4 Patogênese	22
3.4,1 Resultados da infecção por feLV.....	23
3.4,2 A infecção abortiva	25
3.4,3 A infecção regressiva	25
3.4,4 A infecção progressiva	26
3.4,5 A infecção focal.....	27
3.5 Sinais clínicos	28
3,6 Resposta imune ativa.....	28
3,7 Diagnóstico.....	28
3,8 Controle	33
3,9 Problemática do diagnóstico de FeLV	33
3.10 Diagnóstico sorológico de infecções virais.....	35
3,11 <i>Spot Synthesis</i>	36
4. Material e métodos	37
4.1 Locais de Realização do Experimento	37
4.2 Amostras de sangue e soro.....	37
4.3 Mapeamentos de epítomos	38
4.4 Ensaios imunoquímicos	38

4.5 Seleção de epítomos imunodominantes por bioinformática.....	40
4.6 Síntese solúvel de peptídeos.....	41
4.7 Padronização de ELISA indireto	42
4.8 Normatização de valores	43
 5, Resultados.....	 44
5,1 Mapeamento de epítomos e ensaios imunoquímicos.....	44
5.2 Seleção de epítomos imunodominantes por bioinformática.....	45
5.3 Síntese solúvel de peptídeos.....	56
5.4 Padronização do ELISA indireto pp30.....	59
5.5 Teste em ELISA pp30.....	59
6 Discussão	62
7 Conclusão	67
8 Perspectivas	68
9 Referências	69

1. INTRODUÇÃO

Os retrovírus infectam todos os vertebrados e causam doenças graves como: tumores e neoplasias, imunodeficiências, doenças por imunocomplexos, depressão de medula óssea e neuropatias, podendo ser fatais, tanto nos animais quanto nos homens. O vírus da leucemia felina (FeLV), membro da família *Retroviridae* e do gênero *Gammaretrovirus*, provoca a doença leucemia felina. O FeLV, agente infeccioso mais comum entre os gatos, afeta gatos domésticos e felídeos selvagens em todo o mundo. Atualmente não há tratamento específico para a doença e, após infecção, o animal pode apresentar uma sobrevivência curta. No entanto, há casos em que o animal pode desenvolver a doença na forma assintomática e desfrutar de boa qualidade de vida por vários anos. A melhor forma de controle é a vacinação, a identificação de gatos infectados e a segregação desses indivíduos.

A FeLV é caracterizada por quatro cursos de infecção: abortivo em que o animal teve contato com o vírus e houve neutralização viral pelo sistema imune; regressiva em que ocorre uma viremia inicial, porém uma resposta imune mediada por anticorpos neutralizantes atua sobre o vírus provocando um estado de latência; progressiva em que o organismo não é eficiente na neutralização do vírus e ocorre sua replicação; e focal (atípico) em que o vírus se replica de forma isolada em alguns tecidos. Estas variadas formas de infecção e manifestações clínicas são influenciadas pela localização geográfica, sexo, comportamento da população suscetível (estilo de vida) e pelo estado de saúde dos gatos. A doença apresenta prevalência variável e níveis elevados de mortalidade. A relevância da FeLV, não é consequência apenas da gravidade das manifestações clínicas, mas pela complexidade da patogênese e por apresentar diferentes cursos de infecção, o que torna o diagnóstico desafiador, tendo, muitas vezes, que realizar mais de um teste para conduzir a triagem e concluir o *status* infeccioso do animal.

Os métodos de diagnóstico comumente empregados na rotina clínica para detecção da FeLV são o teste imunocromatográfico, o *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ou imunofluorescência (IFA), onde se objetiva detectar a proteína viral p27 no sangue dos felinos. Porém, a detecção da proteína p27 é mais efetiva apenas para animais na fase progressiva, sendo que animais na fase regressiva são erroneamente classificados como negativos, assim se mantendo como propagadores do vírus. Nesse sentido, para caracterizar os cursos de infecção, recomenda-se também, a realização de testes moleculares como a *polymerase chain reaction* (PCR) que objetiva detectar o DNA proviral ou RNA viral. Porém, a PCR é um método diagnóstico complexo, de custo elevado e não aplicável a todos os laboratórios e à rotina de clínicas e de hospitais veterinários. Faz-se necessário, então, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, visando uma melhora no diagnóstico da doença e, por consequência, o seu controle.

Uma alternativa para o diagnóstico, principalmente de gatos na fase regressiva, é a detecção de anticorpos contra o FeLV, porém, na literatura, é apresentado resultados controversos sobre essa perspectiva. O *spot synthesis* é um método que sintetiza simultaneamente peptídeos de proteínas em uma membrana de celulose e, a partir de ensaios que testam sua reatividade com anticorpos específicos contra o agente pesquisado, permite a triagem e mapeamento de peptídeos imunodominantes que são potenciais antígenos a serem usados em ensaios de diagnóstico ou vacinas. Esta forma de mapeamento dos peptídeos imunogênicos de FeLV possibilita o desenvolvimento de diagnóstico sorológico eficiente, independente do curso da doença, para a detecção da infecção pelo vírus.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Desenvolver um ELISA indireto utilizando peptídeos sintéticos, identificados pela técnica de *spot synthesis*, para diagnóstico da infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV).

2.2 ESPECÍFICO

- Identificar as regiões imunogênicas das regiões do gene *env* e *gag* do FeLV através da síntese paralela de peptídeos em membranas (*spot synthesis*) e reatividade com soros sabidamente positivos e negativos;
- Confirmar a imunorreatividade dos peptídeos sintéticos das regiões do gene *env* e *gag* de FeLV utilizando soros de animais naturalmente infectados em diferentes fases de infecção;
- Padronizar os ELISAs indiretos utilizando como antígenos os peptídeos solúveis sintetizados a partir da seleção feita no *spot synthesis*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DA FeLV

Em 1964, ao observar em microscopia eletrônica o brotamento de partículas virais na membrana de linfoblastos malignos de um gato com linfoma de ocorrência natural, William Jarrett e colaboradores descreveram pela primeira vez o vírus da leucemia felina. Em continuidade a esse achado, análises concluíram que ao injetar este vírus experimentalmente em gatos saudáveis, seria possível ocorrer a transmissão dessa neoplasia. A partir de então, todas as formas de neoplasias que acometeram ou acometiam os felinos foram justificadas pela presença do vírus, e assim, se definiu a etiologia infecciosa do FeLV. No entanto, estudos mais recentes estão reavaliando esses conceitos, principalmente, ao se analisar a prevalência do FeLV na população mundial de gatos e a importância do vírus como patógeno, considerando a realização de testes diagnósticos e o uso de vacinas (Greene, 2015).

A prevalência do FeLV apresenta uma importante variação de acordo com a área geográfica, população estudada, sexo, estilo de vida (comportamento do animal) e saúde do animal (qualidade de resposta imunitária) (Biezus, *et al.* 2023; S. khalife & I. Alkusaa, 2023; Mello, *et al.* 2023). Em 2017, Lacerda e colaboradores apresentaram em seu estudo uma prevalência de gatos infectados por FeLV no mundo variando entre 2,5 a 31,3%, de acordo com os fatores já mencionados e com o método diagnóstico utilizado. Em complemento a esse estudo, Giselbrecht e colaboradores (2024) trazem um contraponto sobre essa realidade ao relatar que nas últimas décadas a prevalência do FeLV diminuiu como resultado dos programas de vacinação e do aprimoramento do atendimento veterinário; no entanto, estudos mais recentes apontam uma mudança nesse cenário, que passou a mostrar uma estabilização na queda da prevalência, em decorrência de falha na cobertura vacinal, do surgimento de

variantes virais a partir de mutações genômicas e da manutenção do vírus em frequente contato com grupos de elevada suscetibilidade.

No Brasil, país continental, também é observada uma variação nos valores de prevalência de infecção por FeLV entre as regiões e de acordo com o método diagnóstico empregado (**Tabela 1**). Observou-se uma variação de prevalência de 0% a 47,5%, tendo como base os testes: pesquisa de antígenos, IFA e PCR.

Tabela 1- Prevalência do FeLV no Brasil de acordo com a região, amostragem e métodos diagnósticos empregados. Adaptado da tese de doutorado de Carla Regina Gomes Rodrigues Santos - Seropédica, 2023.

Região	Referência	População testada (S/D = sem dado)	Amostragem	Método diagnóstico	FeLV +
Sudeste	Hagiwara et al., 1997	S/D	298	Pesquisa de antígeno	12,5%
	Barbosa et al., 2001	S/D	135	Pesquisa de antígeno	12,6%
	Souza et al., 2002	S/D	126	Pesquisa de antígeno	17,5%
	Hagiwara et al., 2007	S/D	1952	IFA	6,0%
	Teixeira et al., 2007	Gatos de rua	40	Pesquisa de antígeno	32,5%
	Coelho et al., 2011	Gatos domiciliados	1072	PCR	47,5%
	Almeida et al., 2012	Gatos domiciliados e de abrigos	1094	IFA	11,5%
	Marcondes et al., 2018	Gatos domiciliados e de abrigos	90	Pesquisa de antígeno	1,10%
	Mendes-de-Almeida et al., 2021	S/D	556	Pesquisa de antígeno	11,9%
	Martins et al., 2015	Gatos domiciliados	120	Pesquisa de antígeno	0,80%
	Barros et al., 2017	Gatos domiciliados estritos ou com acesso a rua	159	Pesquisa de antígeno	0,6%

Nordeste	Lacerda et al, 2017	Gatos domiciliados	200	PCR+ Pesquisa de antígeno	3,00%
	Cavalcanti et al., 2018	S/D	81	Pesquisa de antígeno + PCR	27%
	Rocha et al., 2019	Gatos domiciliados	138	Pesquisa de antígeno	5,80%
	Teixeira et al., 2019	Gatos domiciliados, de abrigos e do centro de controle de zoonoses	148	Pesquisa de antígeno	0,00%
	Ribeiro, 2022	S/D	454	Pesquisa de antígeno	1,1%
Centro-oeste	Aquino et al., 2012	S/D	42	PCR	38%
		S/D	138	PCR	26,80%
	Poffo et al., 2017	Gatos de rua e de abrigo	88	Pesquisa de antígeno	4,50%
Sul	Silva et al., 2007	S/D	65	Pesquisa de antígeno	10,80%
	Meinerz et al., 2010	S/D	120	IFA	38,30%
	Hashizume, 2016	S/D	771	Pesquisa de antígeno	1,81%
	Da Costa et al., 2017	S/D	493	Pesquisa de antígeno	31,00%
	Biezu et al., 2019	Gatos domiciliados estritos ou com acesso a rua	274	Pesquisa de antígeno	22,30%
	Biezu et al., 2023	S/D	384	Pesquisa de antígeno e PCR	45,6%
	Diesel et al., 2024	Gatos domiciliados	366	Pesquisa de antígeno e PCR	30,6%
Norte	Sousa et al., 2024	S/D	84	Pesquisa de antígeno	11,9%

3.2 ETIOLOGIA

FeLV, o agente causador da leucemia felina, pertence ao gênero *Gammaretrovirus*, a subfamília *Orthoretrovirinae* e a família *Retroviridae*. Este vírus é envelopado com genoma

constituído por duas fitas simples idênticas de RNA, não complementares, com polaridade positiva (R. Hofmann-Lehamann e K. Hartmann, 2021; Greene, 2015; Flores, 2007).

O genoma do FeLV é composto por três regiões gênicas que codificam as proteínas estruturais e enzimas do vírus: o gene *gag* (*group associated antigen*) codifica proteínas estruturais internas do capsídeo (p27), nucleocapsídeo (p10), matriz (p15), e além dessas, a p12 que atua, provavelmente, na integração do vírus à célula do hospedeiro; o gene *pol* (*polymerase*) que codifica as enzimas que atuam como promotoras da síntese de DNA proviral a partir do RNA viral, da incorporação do provírus no genoma do hospedeiro e maturação da partícula viral pós-brotamento (transcriptase reversa, integrase e protease, respectivamente); e gene *env* (*envelope*) que codifica proteínas do envelope, como a gp70 de superfície que determina os subgrupos do vírus e a proteína transmembrana p15E, que para alguns pesquisadores é possivelmente associada a sobrevivência do vírus frente à resposta imune do hospedeiro (Mathes *et al.*, 1979; Lafrado e Olsen, 1986; Coffin, 1979; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021) (**Figura 1**) (**Quadro 1**).

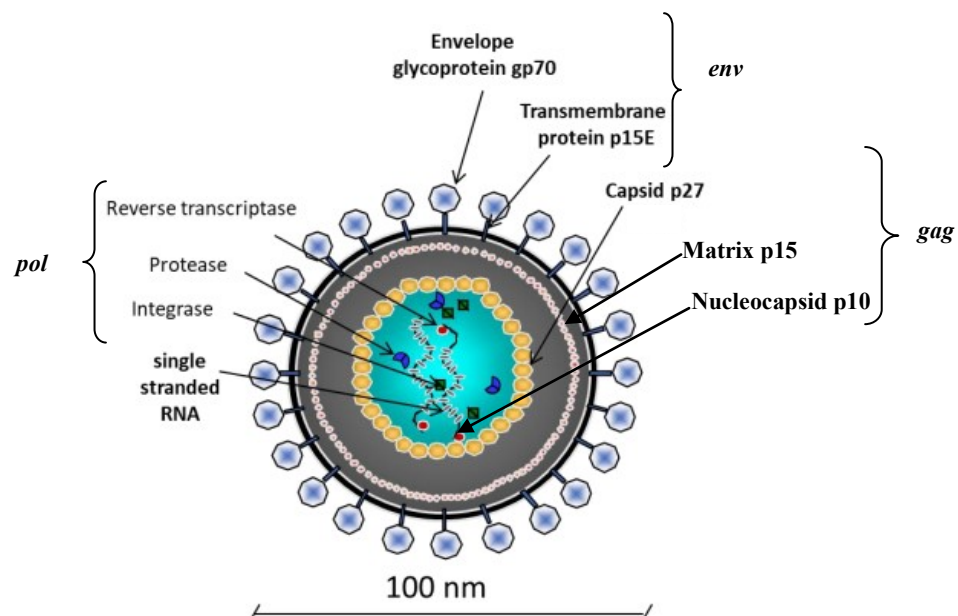


Figura 1 – Estrutura viral do FeLV com representação das três principais regiões do genoma do FeLV (*gag*, *pol* e *env*). Adaptado do Guideline “Feline Leukaemia virus infection – ABCD recommendations and review of the literature” das autoras Regina Hofmann-Lehmann e Katrin Hartmann.

Quadro 1 – Descrição das proteínas codificadas pelas principais regiões do genoma do FeLV.

Região Gênica	O que codifica?	Função
Antígeno associado ao grupo (gag)	Proteína p27	Proteína estrutural do capsídeo
	Proteína p10	Proteína estrutural do nucleocapsídeo
	Proteína p15	Proteína estrutural da matriz
	Proteína p12	Integração do vírus à célula do hospedeiro
Polimerase (pol)	Enzima transcriptase reversa	Promove a síntese de DNA proviral a partir de RNA viral
	Enzima integrase	Promove a integração do provírus no genoma do hospedeiro
	Enzima protease	Promove a maturação da partícula viral pós brotamento
Envelope (env)	Proteínas de superfície gp70	Determina os subgrupos do FeLV
	Proteína transmembrana p15E	Influencia sobre a resposta imune do hospedeiro, auxilia a sobrevivência do vírus

3.3 TRANSMISSÃO

O FeLV se dissemina por contato direto via oronasal entre gatos infectados e gatos susceptíveis. O contato entre gatos de rua e gatos domiciliados ou a introdução de animais pertencentes a uma comunidade infectada pelo FeLV, propicia a disseminação do vírus, o que justifica seu caráter contagioso (Guimarães, 2014; Hofmann-Lehamann e Hartmann, 2021). A infecção é veiculada, principalmente, pela saliva de animais em curso progressivo da doença contendo milhões de partículas virais eliminadas no meio de forma persistente (Francis, *et al.*, 1977; Gomes-Keller, *et al.*, 2006a; Gomes-Keller, *et al.*, 2006b). Segundo Goldkamp e colaboradores (2008) e Gleich e colaboradores (2009), a transmissão horizontal ocorre de maneira mais eficaz em decorrência do comportamento de briga e pelo comportamento social a partir da partilha de vasilhames, do *grooming* e pela utilização comunitária de caixas sanitárias.

A transmissão do FeLV também pode ocorrer a partir das fezes e urina. Gatos infectados com o curso de infecção mais grave, segundo Gomes-Keller (2009) e Cattori e colaboradores (2009), eliminam o FeLV nas fezes e urina. Por outro lado, Hofmann-Lehmann e Hartmann (2021) afirmam ser pouco provável que fezes e urina no ambiente seja uma fonte de infecção de grande efetividade. A transmissão iatrogênica também é possível por meio de reuso de agulhas e demais instrumentos perfuro cortantes, por fômites contaminados ou pela transfusão de sangue (Lutz *et al.*, 2009; Nesina *et al.*, 2015).

Na transmissão vertical, a passagem do vírus da mãe para os filhotes ocorre por via transplacentária, pelo comportamento da mãe de lambear seus filhotes, pelo ato de amamentar ou pela ingestão pelo filhote, de leite contendo vírus (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Caso o contato entre vírus e neonatos ocorra *in útero*, segundo Levy (2000), é comum ocorrer falhas reprodutivas como, reabsorção fetal, aborto e morte neonatal, embora ainda haja uma taxa de sobrevivência após esse período.

3.4 PATOGÊNESE

Na fase inicial da infecção por FeLV, normalmente estabelecida nas primeiras 12 semanas pós exposição, o resultado da infecção é consequência da interação entre o sistema imunológico do gato e o vírus. Esse é o momento em que na maioria dos gatos se determina o curso que a infecção irá tomar (Hofmann-Lehmann, 2008). Alguns dos fatores que podem alterar o equilíbrio entre hospedeiro e vírus são a ocorrência de imunossupressão, coinfeções ou mudanças no ambiente que levam ao estresse do gato (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

O caminho do vírus dentro do gato pode ser diverso (**Figura 2**). A exposição por contato direto via oronasal, é mais frequente, levando ao início da infecção que se estabelece na mucosa da orofaringe, tendo como alvo os linfócitos presentes nesta região (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Em sequência, nas amígdalas e nos gânglios linfáticos ocorre a multiplicação do vírus (Rojko, *et al.*, 1979; Rojko e Kociba, 1991). Nesse ponto, pode ocorrer a viremia primária, em sua maioria nos linfócitos, podendo ocorrer também nos monócitos, onde o vírus se dissemina pelo corpo do animal (Cattori, *et al.*, 2008).

Em seu percurso no organismo do gato, o FeLV pode atingir a medula óssea e assim infectar células precursoras de divisão rápida, como os neutrófilos. Como consequência, observa-se um aumento na concentração de vírions no sangue do animal, o que caracteriza o início da viremia secundária e, a infecção sistêmica (Rojko, *et al.*, 1979; Rojko e Kociba, 1991). Em complemento, Lutz e colaboradores (1983) afirmaram em seu estudo que, em alguns casos, a viremia secundária, pode se desenvolver meses após a infecção.

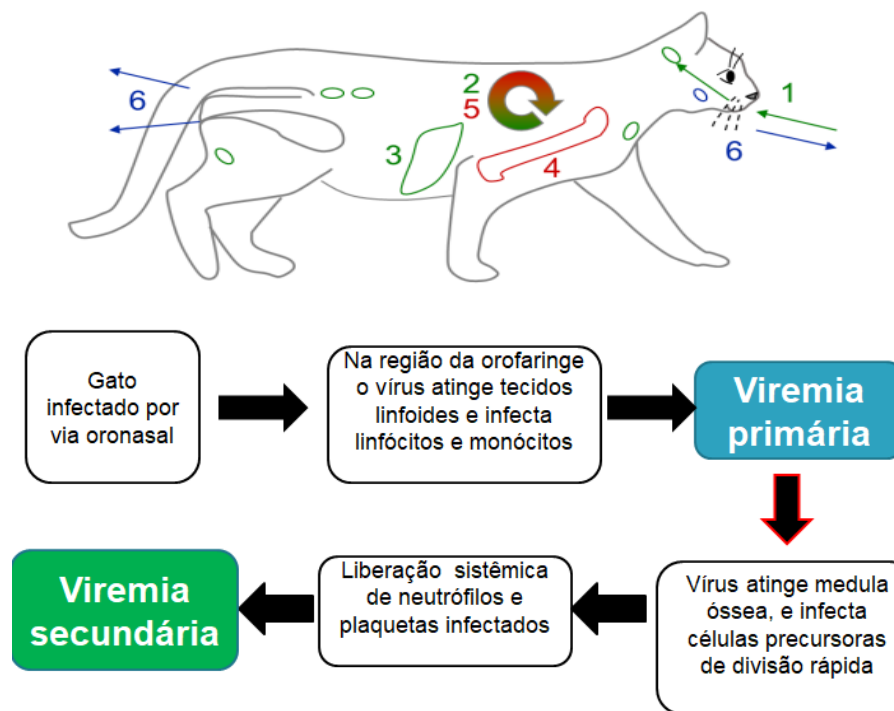


Figura 2 – Percurso do FeLV pelo organismo de um animal infectado. Adaptado do *Guideline “Feline Leukaemia vírus infection – ABCD recommendations and review of the literature”* das autoras Regina Hofmann-Lehmann e Katrin Hartmann, 2021.

3.4.1 RESULTADOS DA INFECÇÃO POR FeLV

Valendo-se da premissa de que cada paciente é único, com o gato infectado por FeLV não é diferente, principalmente em relação ao resultado da infecção. O resultado inicial depende do estado imunológico e da idade do gato, possivelmente o fator determinante do curso da infecção; porém, deve-se considerar a virulência do vírus, a frequência de exposição e a carga infectante (Hoover, *et al.*, 1976; Hartmann, 2005; Guimarães, 2014).

Os testes diagnósticos de para FeLV, que objetivam a detecção da viremia, do provírus e da resposta imune específica ao vírus são ferramentas de grande importância para se classificar o resultado da infecção e, consequentemente, estabelecer o prognóstico da doença. Tais diagnósticos, principalmente a PCR que apresenta uma grande sensibilidade, levaram os estudiosos a questionarem o entendimento da patogênese do FeLV previamente estabelecida (Torres, *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2007; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2008). Inicialmente, para estudar a patogênese do FeLV, os testes base eram o isolamento do vírus e a detecção do antígeno. Nesse sentido, estabeleceu-se a primeira classificação da infecção por FeLV a partir da caracterização da viremia como indetectável, transitória ou persistente. Com o uso da PCR em tempo real e com a quantificação da carga de DNA proviral e RNA viral, foi possível aprimorar essa classificação. Em consequência, gatos tidos como imunes à infecção por FeLV obtiveram resultado positivo para DNA proviral (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001). Seguindo essa linha de raciocínio, alguns anos depois, Helfer-Hungerbuehler (2015), concluiu que o provírus de FeLV se mantém no animal por muitos anos, e nesse tempo, pode acontecer nova viremia e desenvolvimento da doença. Sendo assim, gatos com teste diagnóstico para antígeno negativo e para provírus positivo são considerados portadores

de FeLV, e continuam, assim, podendo disseminar o vírus no ambiente (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Mediante todos estes estudos, foi proposta uma nova classificação dos possíveis cursos de infecção por FeLV, os quais são usados na atualidade, sendo eles, infecção abortiva, infecção regressiva, infecção progressiva e infecção focal (**Figura 3**) (Torres, *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2007; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2008).

Em um período anterior ao advento da PCR, foi descrito uma fase denominada “infecção latente” do FeLV, caracterizada por ausência de antigenemia associada a manutenção de vírus cultivável na medula óssea e em outros tecidos. Atualmente, esta “infecção latente” é equivalente a uma das fases do curso de infecção regressiva. Com o desenvolvimento da PCR, notou-se uma evolução no reconhecimento de animais no estado latente como infectados pelo FeLV. Em um período de uma semana pós-contato com o vírus, o provírus e o RNA viral normalmente se tornam detectáveis pela PCR, mesmo que o animal esteja negativo para antígeno p27-FeLV (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Demonstrando o quão desafiador é a classificação dos cursos de infecção, Westman e colaboradores (2019), explicaram que no período de semanas ou meses, nos gatos em fase inicial de infecção, os testes diagnósticos realizados podem apresentar resultados variados e discrepantes, devido à interação entre o vírus e hospedeiro estarem no seu auge. Essa realidade corrobora com a ideia de que o desenvolvimento do FeLV parece ocorrer em um equilíbrio instável, em que o resultado de infecção é inerente a relação hospedeiro e patógeno, mas em alguns casos essa disputa pode perdurar por toda a vida do gato, sendo possível a mudança de curso de infecção pelo vírus (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 1995; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

O FeLV também é classificado em subgrupos. Os subgrupos de maior relevância são FeLV-A, FeLV-B e FeLV-C. O FeLV-A é o único contagioso e transmitido por via horizontal, os outros subgrupos são resultado de evolução por mutação e recombinação gênica entre FeLV-A e demais sequências de retrovírus endógenos presentes no genoma do hospedeiro (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). A capacidade do FeLV-A, de forma individual, de causar a doença é menor que a dos subgrupos FeLV-B e FeLV-C em associação com o FeLV-A (Rojko, *et al.*, 1988). Além disso, o FeLV-B está associado a doenças malignas como o linfoma mediastinal e o FeLV-C está associado a anemia aplástica (Ahmad e Levy, 2010; Hoover, *et al.*, 1974; Mackey, *et al.*, 1975; Abkowitz, 1991).

A idade do gato no momento da infecção é um dos principais fatores determinantes da suscetibilidade dos gatos ao FeLV, que impacta no estabelecimento do curso da infecção e no resultado clínico (Hoover, *et al.*, 1976; Hosie, *et al.*, 1989). Com o avanço da idade, os gatos se tornam mais resistentes, e essa resistência não se relaciona à imunidade por contato prévio ou vacinação, mas pode se relacionar com o decréscimo do número de receptores celulares (transportador de tiamina 1 -THTR1) para o FeLV-A, ou pela maturação dos macrófagos do felino, no sentido de se tornarem mais eficazes contra o vírus (Hoover e Mullins, 1991; Guimarães, 2014; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Consequentemente, gatos mais jovens são mais propensos a desenvolverem a forma progressiva da doença (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Gatos mais velhos quando infectados tendem a ter infecções abortivas ou regressivas ou, se estiverem acometidos pela forma progressiva, apresentam sinais clínicos mais brandos e um período estendido de aparente boa saúde (Levy, 2000). Nesse sentido, deve se atentar que a resistência ao vírus relacionada com a idade não é

algo imutável, mesmo sendo baixo o risco de um gato adulto ser infectado. O vírus transmitido a partir de mordedura, em que o FeLV é inoculado diretamente na corrente sanguínea, é um exemplo de que a resistência do gato na idade adulta não é incontestável (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

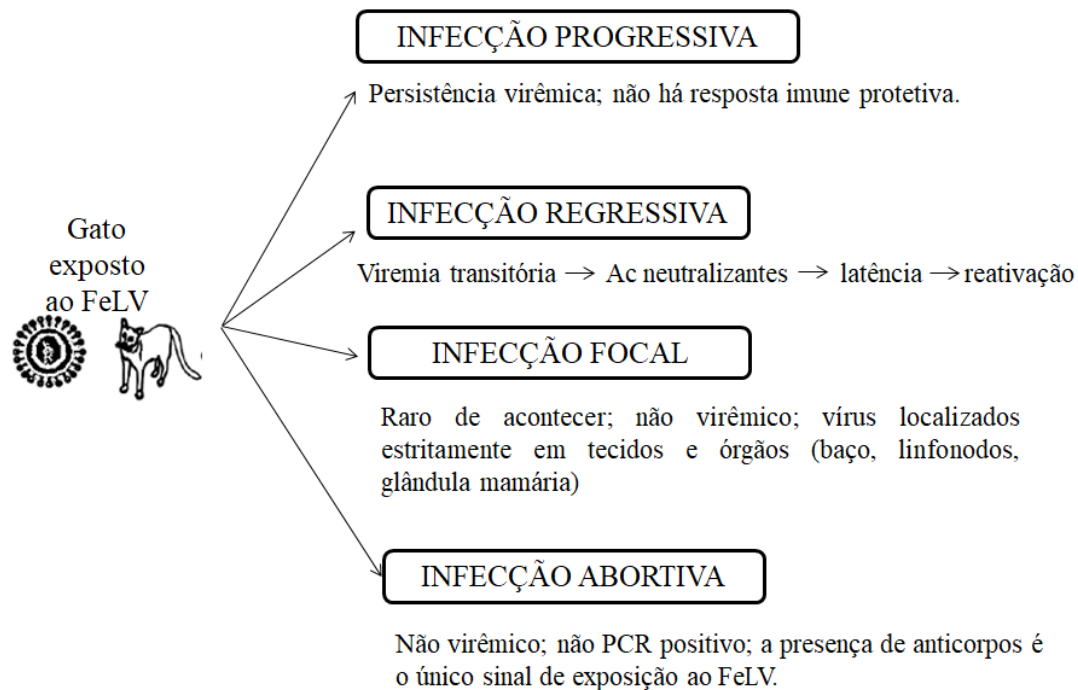


Figura 3: Classificação dos possíveis cursos do FeLV. Adaptado do *Guideline “Feline Leukaemia virus infection – ABCD recommendations and review of the literature”* das autoras Regina Hofmann-Lehmann e Katrin Hartmann, 2021.

3.4.2 A INFECÇÃO ABORTIVA

A infecção abortiva agrupa gatos que apresentam a capacidade de conter o FeLV antes que ocorra a integração do provírus no genoma das células do hospedeiro. Nesses gatos observa-se a interrupção da replicação viral logo após o contato do vírus com o tecido linfóide localizado na orofaringe, a partir de uma resposta imunológica humoral e celular eficaz. Consequentemente, nunca ocorrerá viremia e por isso não se consegue detectar a infecção. Todos os diagnósticos por métodos diretos apresentam resultados negativos (testes para detecção do antígeno p27, detecção do provírus e do RNA viral). O único modo de identificar a exposição do animal ao vírus é a detecção de anticorpos específicos contra o FeLV. Nesse sentido, gatos que se enquadram nesse curso de infecção, normalmente, foram expostos à baixa carga viral. Este é o curso em que o resultado da infecção é o mais favorável para o gato que, nesse caso, tem a mesma expectativa de vida que animais que nunca entraram em contato com o vírus. (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.4.3 A INFECÇÃO REGRESSIVA

O resultado de infecção regressiva é uma particularidade de infecções retrovirais (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Este curso de infecção é tido como mais um

resultado favorável para o animal. O gato apresenta uma resposta imunológica antiviral parcialmente eficaz, propiciando sua recuperação de uma viremia inicial, por conter a replicação do vírus e a viremia (Hoover, *et al.*, 1975; Rojko, *et al.*, 1979; Flynn, *et al.*, 2000; Torres, *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Gatos com infecção regressiva apresentam teste imunocromatográfico negativo para antígeno p27 e positivo na PCR que detecta DNA proviral (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Estes resultados são observados porque não ocorre replicação viral, mesmo que o DNA proviral se mantenha integrado ao genoma do hospedeiro (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020).

Durante a infecção o vírus se espalha estando presente nos linfócitos e monócitos, e, nesta fase chamada de viremia primária, pode se detectar o antígeno do FeLV inclusive em gatos infectados regressivamente (Cattori, *et al.*, 2008; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Consequentemente, esses animais podem momentaneamente serem positivos para antígeno no teste rápido ou em testes baseados no ELISA (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Em complemento, Hofmann-Lehmann e colaboradores (1995), afirmam que mesmo que ocorra queda na eliminação do vírus, em gatos infectados regressivamente, a viremia dura de 1 a 12 semanas. Como ocorre a replicação do vírus no hospedeiro, durante a primeira viremia, é fundamental realizar mais de um teste para detecção de antígeno para diferenciar gatos com infecção progressiva de gatos com infecção regressiva. Alguns gatos podem apresentar resultados inconsistentes nessa fase inicial de infecção, demonstrada pela alternância entre resultados positivos e negativos em testes para detecção de antígeno, que ocorre devido à interação entre vírus e anticorpos neutralizantes (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 1997; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006).

Nesta fase, antes caracterizada como “viremia transitória”, Lutz e colegas (1980) afirmaram que os gatos podem eliminar o vírus no ambiente. No entanto, a partir da contenção da replicação do vírus por anticorpos neutralizantes, se interrompe essa eliminação (Lutz, *et al.*, 1983; Flynn, *et al.*, 2000; Flynn, *et al.*, 2002). Em infecções regressivas, não há eliminação do vírus pela saliva durante a infecção latente, porém, pode ocorrer a passagem de DNA proviral para animais suscetíveis por transfusão sanguínea (Nesina, *et al.*, 2015).

Uma característica inerente à infecção regressiva é a possibilidade de reativação da infecção, principalmente devido à ocorrência de imunossupressão, mas também podem ocorrer de forma espontânea (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Comumente a reativação se estabelece após períodos de estresse do gato ou pelo uso de altas doses de glicocorticoides (Rojko, *et al.*, 1982). Em decorrência à reativação, o gato se torna virêmico, passa a eliminar vírus pela saliva, torna-se suscetível ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao FeLV e apresenta resultado positivo para detecção de antígeno p27 (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Pesquisadores complementam que períodos de estresse em animais mais jovens é mais crítico para a reativação viral, por outro lado sabe-se que há uma perda dessa probabilidade com o avanço do tempo/idade (Rojko, *et al.*, 1982; Madewell e Jarrett 1983; Pedersen, *et al.*, 1984; Pacitti e Jarrett, 1985; Hayes, *et al.*, 1992; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001).

3.4.4 A INFECÇÃO PROGRESSIVA

Gatos que se enquadram no curso de infecção progressiva se encontram no pior resultado de infecção por FeLV. Esses são caracterizados por uma insuficiente atuação do

sistema imune, por baixos níveis ou ausência de anticorpos neutralizantes e por não ocorrer resposta imune celular específica para FeLV (Englert, T., *et al.*, 2012; Beatty, *et al.*, 2011; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Em consequência, o vírus não é contido no início do processo infeccioso, levando a uma replicação significativa momentaneamente nos tecidos linfoides (primeira viremia), em seguida na medula óssea e nos tecidos epiteliais mucosos e glandulares (segunda viremia) (Rojko, *et al.*, 1979). Nesse sentido, a eliminação do FeLV e transmissão estão associadas à chegada do vírus nos tecidos epiteliais mucosos e glandulares. Como resultado da presença do vírus na medula óssea, reflexo da manutenção da replicação viral, observa-se a infecção de neutrófilos e plaquetas, associados aos linfócitos e monócitos já infectados na primeira viremia (Pepin, *et al.*, 2007; Cattori e Hofmann-Lehmann, 2008; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020).

Uma característica comum destes gatos é a condição de viremia persistente, e assim, permanecem como disseminadores do vírus por toda a vida, liberando de forma contínua partículas virais viáveis (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021), contaminando o ambiente e representando risco para animais susceptíveis (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Gatos no curso de infecção progressivo apresentam teste imunocromatográfico positivo para antígeno p27 e positivo nas PCRs que detectam DNA proviral e/ou RNA viral. Estes animais devem ser segregados, independente do seu estado clínico e deve-se testar outros gatos que possam ter entrado em contato com os reagentes/positivos.

Por estarem debilitados, é possível que esses gatos sofram com doenças fatais associadas ao FeLV e evoluam para o óbito em pouco tempo (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 1997; McCaw, *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2007; Gleich, *et al.*, 2009; Helfer-Hungerbuehler, *et al.*, 2015b; Little, *et al.*, 2020). A expectativa de vida desses animais, nesta fase, é de 2-3 anos após a infecção, porém, se o manejo for feito de forma adequada, esses podem ter uma vida saudável por muitos anos (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.5.4 A INFECÇÃO FOCAL

A infecção focal apresenta inconstância nos resultados dos testes diagnósticos ao longo do tempo, e consequentemente não se estabelece um padrão descritivo como os demais cursos de infecção (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Como característica desse curso de infecção, o antígeno FeLV p27 pode ser encontrado no sangue de forma intermitente ou em baixa quantidade, e diferentemente das outras formas, as partículas virais infecciosas não são encontradas no sangue (Jarrett, *et al.*, 1982b; Lutz, *et al.*, 1983; Jarrett, *et al.*, 1991; Miyazawa e Jarrett, 1997). Nesse sentido, em testes que detectam o antígeno, pode se obter resultados fracamente positivos ou discordantes, em repetição periódica, onde resultados positivos e negativos se alternam (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Outra característica importante desse resultado de infecção é que o sistema imunológico do hospedeiro mantém a replicação do FeLV localizada estritamente em alguns tecidos, como baço, gânglios linfáticos, intestino delgado, trato urinário ou glândulas mamárias (Pacitti, *et al.*, 1986; Hayes, *et al.*, 1989; Hoover e Mullins, 1991; Jarrett, *et al.*, 1991; Miyazawa e Jarrett, 1997). Mediante esses dados, gatos neste curso de infecção, são raros e não tem importância epidemiológica por ter baixa carga viral circulante (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.6 SINAIS CLÍNICOS

O desenvolvimento de sinais clínicos normalmente é resultado da replicação ativa do vírus, portanto é na infecção progressiva que se consegue conectar o aparecimento de sinais clínicos a infecção por FeLV (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). No entanto, deve-se atentar que gatos com infecção progressiva podem ser clinicamente saudáveis por anos, mas, ainda assim, têm uma sobrevida curta (Addie, *et al.*, 2000; Levy, *et al.*, 2006b; Gleich and Hartmann, 2009; Gleich, *et al.*, 2009; Spada, *et al.*, 2008).

Gatos acometidos por FeLV podem apresentar sinais clínicos variados como distúrbios da medula óssea (anemia, neutropenia, alterações plaquetárias), tumores (linfoma), imunossupressão que como consequência promove a ocorrência de infecções secundárias e síndromes clínicas (doenças imunomediadas), neuropatias, distúrbios reprodutivos e *fading kitten syndrome* (Hoover and Mullins, 1991; Crawford, *et al.*, 2001; Hartmann, 2011b; Hartmann, 2012b; Mazzotti & Guimarães, 2014). Nesse sentido, a infecção progressiva por FeLV possibilita uma diversidade de afecções, porém é difícil discernir os sinais decorrentes da infecção por FeLV dos sinais gerados pelas doenças concomitantes. Embora se associe o vírus ao surgimento de tumores em gatos, a casuística dos gatos acometidos por FeLV, quando atendidos em primeira consulta por veterinários, são por quadros de anemia e imunossupressão, e não por ocorrência de neoplasias (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.7 RESPOSTA IMUNE ATIVA

Os maiores títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus são observados, predominantemente, nos gatos que venceram a viremia primária do FeLV (Russel e Jarrett, 1978; Lutz, *et al.*, 1980; Flynn, *et al.*, 2002). Consequentemente, gatos com infecção regressiva apresentam níveis de anticorpos séricos mais elevados do que gatos com infecção progressiva (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001; Parr, *et al.*, 2021). A presença de anticorpos produzidos pelo hospedeiro contra o vírus se torna, então, uma possibilidade interessante para se constatar que o gato está infectado (Major, *et al.*, 2010).

A atuação dos linfócitos T citotóxicos (LTC) também se destaca na resposta imune ativa contra o FeLV (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Segundo Lutz e colaboradores (1980), os LTC's são importantes quando nem todos os gatos imunes (vacinados) desenvolvem elevados níveis de anticorpos séricos. Além disso, a vacinação contra FeLV também protege os gatos na ausência de anticorpos neutralizantes relacionados ao vírus (Poulet, *et al.*, 2003; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006).

3.8 DIAGNÓSTICO

A identificação de gatos infectados pelo FeLV é mandatória para o controle da disseminação desse vírus (Levy, *et al.*, 2008; Little, *et al.*, 2011). A complexidade da patogênese, os diferentes cursos de infecção e a possibilidade de mudança no *status* infeccioso com desenvolvimento da doença, tornam o diagnóstico e o prognóstico um desafio para o Médico Veterinário (Lutz, *et al.*, 1983; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001; Torres, *et al.*, 2005). Para tanto, o diagnóstico deve se fundamentar na interpretação dos resultados dos testes sorológicos e moleculares, tendo como base a patogênese e a epidemiologia da doença. (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

A *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) estabelece diretrizes sobre a realização de teste de triagem de gatos para FeLV. Neste guia, é normatizado a necessidade de se saber o status de infecção por FeLV, a importância de se estabelecer um diagnóstico preciso e as formas de controle sobre a disseminação do vírus, (Little, *et al.*, 2020; Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020). Em complemento, Hofmann-Lehmann e Hartmann (2020), ainda discutem sobre a necessidade de se acompanhar os gatos a serem introduzidos em lares, testando o animal para FeLV após 6 semanas do teste inicial, excluindo assim, qualquer risco de infecção. Lembrando que este protocolo deve ser realizado antes de trazer o gato para casa (Levy, *et al.*, 2001; Little, *et al.*, 2020).

Da mesma forma, a *European Advisory Board on Cat Diseases* (ABCD), também propôs uma ferramenta que auxilia Médicos Veterinários no atendimento de gatos potencialmente infectados pelo FeLV, fundamentada na avaliação de risco do gato ser acometido pela FeLV, na descrição do quadro clínico apresentado e avalia também as diferentes características dos testes diagnósticos, o período em que um teste poderá produzir resultados positivos e o valor preditivo positivo e negativo. Este recurso também aborda como se confirma os resultados obtidos quando se tem que repetir testes para classificação dos diferentes cursos de infecção. Ao utilizar essas ferramentas, aumenta-se a possibilidade de se estabelecer um diagnóstico confiável e acurado da doença (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Os métodos diretos de detecção de vírus são os mais utilizados para diagnóstico da infecção por FeLV, cada um apresenta suas especificidades detectando componentes virais (Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Os resultados dos testes diretos não são alterados pela presença de anticorpos maternos, sendo assim filhotes e neonatos podem ser testados em qualquer idade (Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). O ELISA, os métodos de imunomigração (Imunocromatográfico), o ensaio de imunofluorescência (IFA), o isolamento viral, a PCR ou transcriptase reversa PCR (RT-PCR) são a escolha quando se visa o diagnóstico de FeLV (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Caracterização dos alvos dos testes diretos utilizados para diagnóstico da FeLV (Adaptado de Katrin Hartmann and Regina Hofmann-Lehmann, 2020).

Teste diagnóstico	Alvo do teste
ELISA e ensaio de imunomigração	Antígeno FeLV p27 livre no sangue
PCR	DNA proviral do FeLV integrado no genoma do hospedeiro
PCR- transcriptase reversa (RT-PCR)	RNA viral do FeLV
Isolamento viral	Vírus replicante no sangue
Ensaio de imunofluorescência direta	Antígeno p27 intracelular em esfregaços de sangue

Os testes mais utilizados na rotina para detecção do antígeno FeLV p27 livre são o ELISA (laboratorial), ou os testes *point of care* (POC) (teste rápido). O antígeno p27 é produzido e liberado no sangue pelas células infectadas pelo vírus e, para a sua detecção nos testes acima pode ser utilizado soro, plasma ou sangue total (Little, *et al.*, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021; Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). No entanto, este método não deve ser executado utilizando lágrimas ou saliva, devido à baixa sensibilidade nessas amostras biológicas e pelo fato de a liberação do antígeno ser intermitente, podendo gerar resultados falsos negativos (Little, *et al.*, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). São testes que tem como característica serem de fácil execução e apresentarem mínima variação em relação a sensibilidade e especificidade diagnóstica (Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). A identificação do antígeno p27 do FeLV é sugerida como método de triagem para infecções progressivas e para detecção de gatos infectados regressivamente na fase de viremia transitória (Barr, 1996). Obter resultado positivo para antígeno p27 no sangue total, soro ou plasma, normalmente, é indicativo de que o gato está virêmico no momento do exame, porém há exceções (Jarrett, *et al.*, 1982b; Lutz, *et al.*, 1983; Jarrett, *et al.*, 1991) (Figura 4).

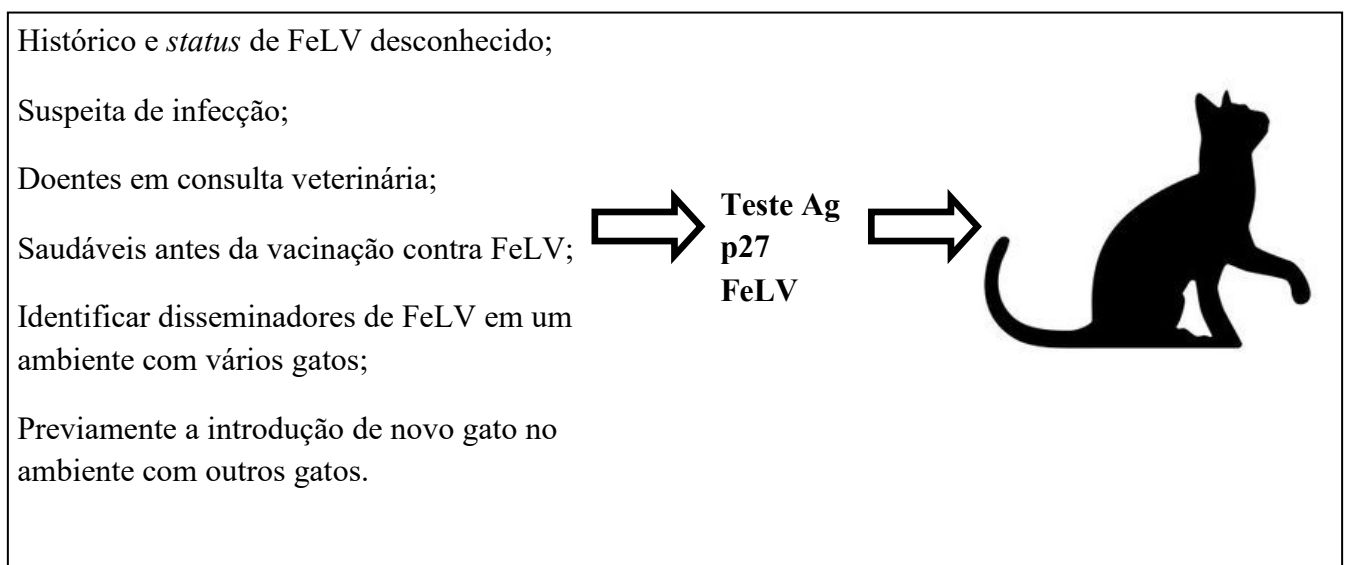


Figura 4 – Indicações de quando realizar o teste para detecção do antígeno p27 na triagem do FeLV. (adaptado de R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Ao se ater à possibilidade de ocorrência de resultados discordantes ou que variam durante a fase inicial de infecção, momento em que o equilíbrio entre vírus e resposta imune do hospedeiro ainda não foi estabelecido, resultados positivos para antígeno p27 devem ser testados novamente (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020). Nesse sentido, recomenda-se a realização de PCR para detectar DNA proviral. Caso não haja a possibilidade devido ao valor do teste e ou pela indisponibilidade, é recomendada a realização de um novo teste POC, de preferência de marca diferente da utilizada no primeiro teste (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Nota-se a importância de se ter domínio no conhecimento da dinâmica da infecção por FeLV e sobre as possibilidades de testes que podem ser utilizados, para assim realizar um diagnóstico e manejo mais adequado (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

A PCR detecta DNA proviral, ou seja, o provírus incorporado ao genoma celular do hospedeiro. Já o RT-PCR identifica a presença do RNA viral nos fluidos corporais como soro/plasma ou associado às células. Os materiais possíveis para se realizar ambos os testes são sangue, saliva, medula óssea e tecidos em que o vírus tenha tropismo (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Os métodos moleculares para detecção do FeLV, promovem a amplificação das sequências dos genes do vírus e, quando realizados nas condições ideais, são os testes de maior sensibilidade para o diagnóstico e, por isso, se recorre a esses para analisar resultados discordantes nos testes de antigenemia (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021) (**Figura 5**).

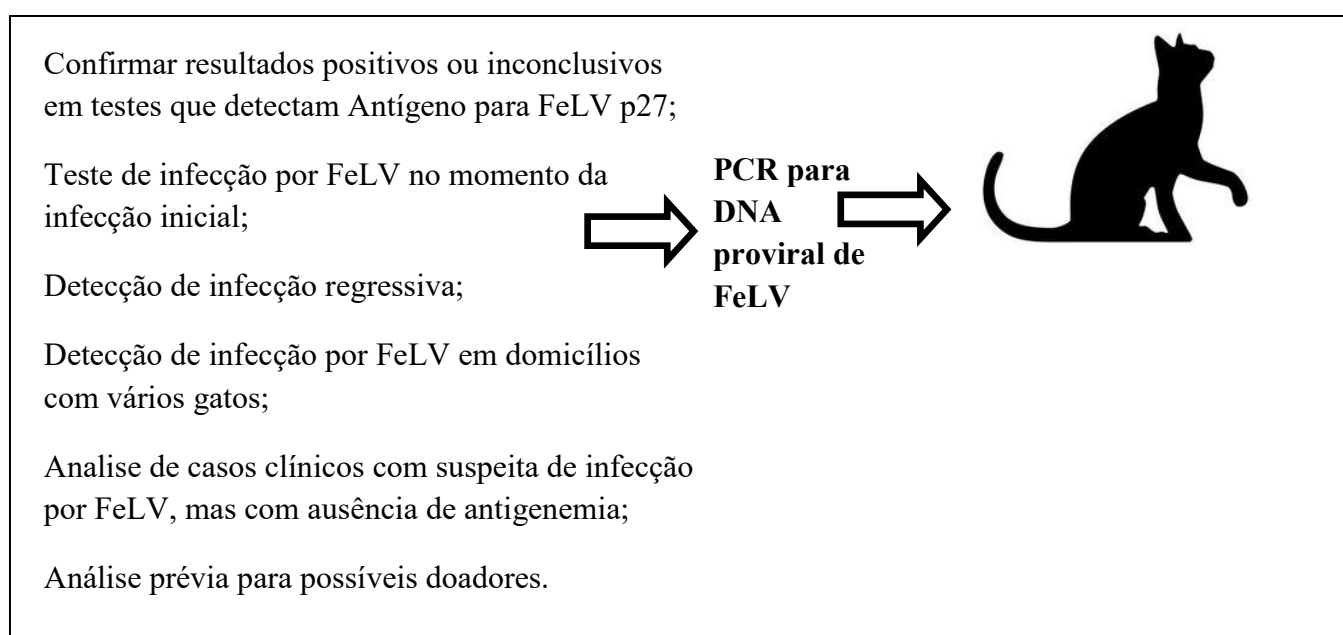


Figura 5 – Indicações de quando utilizar a PCR para DNA proviral na triagem do FeLV. (adaptado de R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Devido à alta sensibilidade dos testes moleculares, deve-se ser criterioso ao interpretar os resultados da PCR. Resultado positivo para DNA proviral FeLV mostra que o gato foi exposto ao vírus e pode ter desenvolvido curso de infecção progressivo ou regressivo. Já os resultados negativos para DNA proviral FeLV indicam que o hospedeiro não apresenta provírus integrado ao seu genoma, mostrando assim, nenhum contato prévio com o vírus, ou atesta uma infecção abortiva, ou processo infeccioso em fase inicial (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

A detecção do FeLV a partir de RNA viral é um processo recente. Em testes de antígeno p27 positivos para FeLV, o RT-PCR sempre será positivo em amostras de sangue, ou soro, ou plasma (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Por outro lado, o RNA viral plasmático e celular também podem ser encontrados na ausência de viremia, isso ocorre em gatos com infecção regressiva (Gomes-Keller, *et al.*, 2006a; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2007; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2008). O uso de RT-PCR com amostras de saliva e plasma é uma interessante estratégia para detectar infecção com uma semana após a exposição, e essa

possibilidade é viável e eficaz, pois identifica a infecção antes do teste de antígeno p27 e PCR DNA proviral (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006; Cattori, *et al.*, 2009).

O ensaio de imunofluorescência direta (IFA) foi o primeiro teste diagnóstico que possibilitou a detecção do FeLV a campo em gatos pertencentes ao curso de infecção progressivo (Hardy, *et al.*, 1973). Este método foi introduzido na rotina de diagnóstico ao encontrar em granulócitos, linfócitos e plaquetas componentes da proteína do gene *gag* do vírus nesses animais. Além disso, em esfregaços de sangue de gatos em que o vírus já alcançou a medula óssea, a IFA pode detectar o antígeno FeLV p27. Nesse sentido, a IFA é um método diagnóstico interessante para se identificar positividade em momentos mais tardios (aproximadamente 6 semanas), mais especificadamente na segunda viremia, portanto, esses resultados positivos estão mais associados a infecções progressivas (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021; Hardy, 1981b; Hardy, 1991; Levy, 2000). Consequentemente, a sensibilidade do método diagnóstico IFA é menor que a do ELISA, pois a IFA detecta positividade para FeLV mais tardiamente (cerca de três semanas), em relação ao ELISA (Hawks, *et al.*, 1991).

O isolamento do FeLV em cultivo celular detecta vírus replicante no sangue (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020). Na época de seu desenvolvimento, esta técnica era a de escolha para diagnosticar gatos com infecção progressiva. Uma característica interessante é que o isolamento de vírus identifica animais positivos uma semana antes se comparado às técnicas de detecção de antígeno p27 (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

O diagnóstico do FeLV também pode ser realizado por métodos indiretos (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Os testes de anticorpos são empregados para detectar resposta imunológica do hospedeiro, e assim, contato e/ou a infecção por FeLV. Esses são mais empregados para identificar gatos infectados nos cursos de infecção regressivo e abortivo, em que os testes de antígeno podem não ser mais capazes de detectar o vírus. O emprego destes testes é útil em casos que o animal já foi pré-exposto ao FeLV ou pós vacinação (Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Os testes de anticorpos, como o teste de neutralização viral, consistem no emprego de cultura celular para medir a proporção de anticorpos neutralizantes ativos de FeLV no hospedeiro (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Estes são usados principalmente para diferenciar os cursos de infecção (Lutz, *et al.*, 1983; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2007). Nesse sentido, gatos com infecção regressiva, predominantemente, demonstram potente resposta imune neutralizante após uma viremia transitória, enquanto gatos pertencentes ao curso de infecção progressivo apresentam títulos baixos ou a inexistência de anticorpos neutralizantes tanto na primeira quanto na segunda viremia (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Porém, não se pode tomar esse dado como padrão, uma vez que a presença de anticorpos e a imunidade não é algo imutável. Há gatos vacinados que não desenvolvem anticorpos e há gatos protegidos contra FeLV, mesmo não tendo anticorpos detectáveis (Englert, *et al.*, 2012; Poulet, *et al.*, 2003; Sparkes, *et al.*, 2003; Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2006; Langhammer, *et al.*, 2006; Boenzli, *et al.*, 2014).

3.9 CONTROLE

O controle do FeLV, é baseado na vacinação, identificação e segregação dos infectados. A adoção dessas práticas é indispensável em locais com aglomeração de gatos, com abrigos e gatis de reprodução (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Nas décadas após a descoberta do vírus, foram implementados programas fundamentados na realização de testes e remoção de infectados, como ocorreu na Holanda em 1974 (Weijer, *et al.*, 1986). Por ser envelopado, o vírus é instável no ambiente. Fora do hospedeiro o vírus é facilmente inativado por detergentes, calor, desidratação ou desinfetantes. Ao se pensar na forma principal de transmissão, evitar o contato direto, realizar a segregação e a desinfecção de ambientes são ações que devem ser executadas em domicílios, clínicas veterinárias e abrigos (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.10 PROBLEMÁTICA DO DIAGNÓSTICO DA FeLV

O FeLV apresenta diagnóstico difícil devido as características do vírus que leva a cursos de infecção variados. Para o diagnóstico eficaz é necessário utilizar mais de um teste laboratorial, porém cada um tem suas vantagens e limitações. A PCR para detecção do DNA proviral é um método interessante para detectar infecções latentes, assim como o ELISA, IFA, teste de imunocromatografia e teste POC são utilizados para identificar viremia ativa. Porém, ainda se observa resultados desafiadores como os testes falsos negativos e testes que detectam o vírus de forma tardia. Outro entrave é a disponibilidade de testes na rotina. Associar o resultado dos testes diagnósticos para FeLV ao exame clínico e ter vasto conhecimento sobre a infecção e sua patogênese é de grande importância para o Médico Veterinário (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020).

No atendimento diário de clínicas veterinárias o diagnóstico de FeLV é comumente direcionado somente à detecção do antígeno p27 livre, utilizando POC teste como primeira escolha. No entanto, deve se atentar que ao utilizar esse teste diagnóstico, apenas são detectados gatos com infecção progressiva e, em alguns casos, gatos com infecção regressiva infectados que se encontram na viremia transitória ou quando ocorre a reativação do vírus, mas, de um modo geral, não detectam gatos em curso de infecção regressiva e abortiva (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). A PCR para DNA proviral é capaz de identificar com maior propriedade gatos infectados pelo FeLV se comparado aos testes de antígeno, já que gatos regressivos também apresentam resultados positivos neste método (Hofmann-Lehmann, *et al.*, 2001; Gomes-Keller, *et al.*, 2006a; Englert, *et al.*, 2012).

O teste ELISA e o ensaio imunocromatográfico, testes para antígeno FeLV p27 livre, normalmente detectam gatos positivos para FeLV entre três a seis semanas pós exposição. Porém, é possível que gatos recém-expostos, testem negativos para antígeno FeLV p27, mesmo sendo hospedeiros do vírus, tendo como consequência uma possível evolução para o curso de infecção progressiva. Uma limitação importante é que o ELISA não é capaz de identificar animais regressores ou abortivos (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Sabe-se que para a execução do teste ELISA pode se utilizar como amostra soro, plasma e sangue total, porém, ao utilizar sangue total, estudos demonstram a ocorrência de falso-positivos, sendo que a maior porcentagem deste resultado se concentrou em amostras hemolisadas (Barr, 1996). Nesse sentido, deve-se priorizar o uso de soro e plasma nos testes ELISA e POC baseado em ELISA (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Outra

possibilidade de ocorrência de falso-positivos são os erros de execução, já que o teste em questão é de grande sensibilidade (Hardy e Zuckerman, 1991; Macy, 1991). Com objetivo de otimizar a coleta de amostras para realização do ELISA foi desenvolvido uma versão desse teste utilizando saliva ou lágrimas. Porém, como a liberação do antígeno FeLV p27 ocorre de forma intermitente, este novo modo de execução não é indicado, por poder gerar resultados falso-negativos nos testes (Benveniste, *et al.*, 1975; Hawkins, 1986; Lutz e Jarrett, 1987; Hawkins, 1991; Babyak, *et al.*, 1996). Westmann e colaboradores (2017) (2019b) realizaram um estudo comparando diferentes testes POC para FeLV utilizando saliva, e obtiveram como resultado uma menor sensibilidade diagnóstica, o que confirma não ser interessante o uso de saliva como amostra em testes de antígeno. Testes *point of care* (POC) podem apresentar valores diagnósticos variados devido ao modo de execução, a forma como o teste foi produzido e a qualidade da amostra, portanto é interessante confirmar o resultado por outros métodos diagnósticos ou realizando outro teste POC de marca diferente (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020).

Métodos que utilizam técnicas moleculares, como PCR e RT-PCR, são de grande sensibilidade, e por isso, auxiliam na determinação de resultados em testes de antígeno p27 discordantes. A PCR é uma técnica que exige um ambiente laboratorial bem equipado e equipe bem treinada. A ocorrência de alterações qualitativas em relação a amostras a partir de sua manipulação, pode danificar o material genético, tendo como consequência um resultado falso negativo. Por outro lado, qualquer contaminação cruzada pode levar a resultados falso positivos. Esses erros técnicos podem diminuir a sensibilidade e especificidade dos resultados da PCR e da RT-PCR (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Outra possibilidade de se obter resultado falso-negativo na PCR é que, sendo um retrovírus, o FeLV está sujeito a mutações e, por isso, variações nas estirpes dos vírus circulantes. Como consequência os *primers* podem não se ligar a sequência alvo, sendo essa uma etapa fundamental para que ocorra a amplificação do genoma viral e como consequência um resultado acurado (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Pela complexidade na realização da técnica e seu alto custo, a PCR se torna um recurso de difícil uso na rotina de clínicas, pensando inclusive na necessidade de um resultado mais imediato, o que fundamenta o uso de teste rápido para antígeno como a opção mais viável na rotina de clínicas e hospitais veterinários (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020). Por outro lado, Mattoso e colaboradores (2020), trazem uma visão interessante sobre o uso de PCR para detecção do DNA proviral do FeLV, a partir de amostras de *swab* da mucosa retal, oral e conjuntival. Os autores apontam como benefício o menor estresse do médico veterinário, do tutor e do animal no momento da coleta do sangue, o que diminui o risco de danos à saúde do gato.

O isolamento viral, mesmo propiciando detecção mais precoce do FeLV, se comparado aos testes de detecção de antígeno, apresenta características que dificultam seu uso na rotina. Por ser um método oneroso, demorado e de difícil execução, não é um teste prático para ser realizado na rotina, não sendo recomendado para triagem de gatos. Esse teste requer laboratório com instalações especializadas, o que limita acesso em clínicas, e obtenção de um pronto resultado (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020).

A IFA é um teste de diagnóstico que só detecta resultado positivo mais tardiamente e, se comparada ao ELISA, se torna positivo semanas depois. Isso prova a menor sensibilidade do IFA em relação ao ELISA. Gatos progressivamente infectados apresentando, especialmente, neutropenia e trombocitopenia relacionados ao acometimento da medula óssea

(segunda viremia) pelo vírus, com resultado negativo na IFA, indica IFA falso-negativo. O método IFA não é de fácil execução na rotina diária, erros de técnica, como na realização de esfregaços espessos e interpretação inadequada, podem levar a resultados falso-positivos ou negativos. Nesse sentido, é um processo trabalhoso, demorado e impraticável para uma rotina que necessita de resultados mais rápidos, sem contar a requisição de laboratório e pessoas especializadas (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Os testes de anticorpos para FeLV, raramente são usados na rotina devido a sua baixa disponibilidade e por requerer laboratório especializado e pessoas treinadas para a sua execução. Outro ponto que deve se atentar é que a presença única e exclusiva de anticorpos no gato, não comprova que a infecção está ativa ou a existência de vírus livre circulante. Um teste *point of care*, recém-desenvolvido na Europa que detecta anticorpos contra antígeno p15E FeLV ainda necessita de mais estudos para comprovar sua utilidade diagnóstica, fato este que limita seu uso na rotina de clínicas e hospitais (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2020; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

3.11 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES VIRAIS

O diagnóstico sorológico das infecções virais se estabelece a partir da detecção de anticorpos específicos que resultam da resposta do sistema imune do hospedeiro (Silva, *et al.*, 2023). A identificação de anticorpos no soro também permite avaliar se houve exposição prévia do animal a um agente infeccioso, estabelecer diagnóstico ou o grau de exposição de uma população ao patógeno (Tizard, 2019). As metodologias rotineiramente utilizadas no diagnóstico sorológico são, principalmente, teste de neutralização, teste de inibição da hemaglutinação, imunofluorescência, teste rápido (imunocromatografia) e teste imunoenzimático.

O diagnóstico sorológico tem como vantagem a automatização dos métodos empregados e a disponibilidade comercial dos reagentes diagnósticos para vários patógenos virais, o que possibilita que com apenas uma amostra seja possível obter resultado diagnóstico adequado (Markey, *et al.*, 2006). Segundo Abbas, Lichtman e Pillai (2019), a especificidade de anticorpos para antígenos particulares, determina a valiosidade dos anticorpos como reagentes para a detecção, purificação e quantificação de antígenos. A produção de anticorpos contra variados tipos de macromoléculas e compostos químicos, possibilita que técnicas que tenham como base anticorpos, sejam capazes de avaliar qualquer tipo de molécula em solução ou a nível celular (Abbas, Lichtman e Pillai, 2019).

Métodos imunológicos utilizados para quantificar a concentração de antígenos, proporcionam ao teste uma maior sensibilidade e especificidade, sendo esses, então, os testes de maior relevância na abordagem clínica e na pesquisa científica. Os métodos quantitativos em sua essência se baseavam no uso de marcadores associados a antígeno e anticorpo. Atualmente, a ligação de forma covalente de antígenos ou anticorpos a uma enzima, e sua quantificação, por meio de espectrofotômetro e a conversão por ação enzimática de um substrato claro em um produto colorido, caracteriza um dos mais importantes diagnósticos sorológicos, o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Abbas, Lichtman e Pillai, 2019).

O ELISA indireto, tema central desse estudo, é um método sorológico que possibilita, a partir da detecção do anticorpo, referente a presença do vírus no hospedeiro, o diagnóstico da doença. O emprego da técnica de *Spot Synthesis* como base para seleção do peptídeo

sintético a ser utilizado como antígeno no ELISA, em padronização, demonstra a importância de se associar técnicas para aperfeiçoar o diagnóstico sorológico.

3.12 *Spot Synthesis*

A técnica de *Spot Synthesis* é uma abordagem inovadora aplicada com objetivo de realizar a caracterização e o mapeamento de epítomos (Laune et al., 2002; Alvarenga et al., 2002; Machado De Avila et al., 2004). O método tem como característica sua simplicidade, rapidez de execução, necessita de poucos reagentes e flexível no que se refere à escala de síntese e uso dos peptídeos.

A técnica consiste em dispensar gotículas contendo peptídeos em uma variedade de posições pré-estabelecidas em uma membrana porosa, formando pontos separados de peptídeos (Frank, 1996). Posteriormente, é feita a avaliação da reatividade de anticorpos monoclonais ou policlonais em relação a peptídeos sintetizados na membrana, tendo a possibilidade de cobrir parte ou a totalidade das principais proteínas do vírus em estudo, com intervalos de dois em dois ou três em três aminoácidos C-terminais (Frank, 1992).

A membrana de celulose, material suporte com maior frequência de uso na técnica do *spot Synthesis*, é um material de baixo custo, poroso, hidrofílico, flexível e estável diante os solventes orgânicos e ácidos usados na síntese de peptídeos. Hilpert, Winkler e Hancock (2007) complementam esse dado relatando que por não ser tóxica, a membrana de celulose é uma excelente estrutura para triagem de amostras biológicas. Porém, a celulose apresenta uma instabilidade em condições químicas adversas às acima especificadas, portanto, empenharam-se em desenvolver o método *spot Synthesis* na forma mais leve, utilizando para isso a síntese FMOC, onde se utilizam sempre os mesmos grupos protetores (Winkler, 2011). Uma membrana pode conter uma variedade de peptídeos isolados, possibilitando a síntese de sequências peptídicas de patógenos distintos em uma área reduzida. A possibilidade de programar volumes e posições adequados permite que não ocorra interações indesejadas entre os *spots*. Na formulação da membrana, o tamanho do *spot* é inerente ao volume dispensado em relação às propriedades de adsorção do material do papel e pela volatilidade do solvente (Frank, 1992). Para Toeptert e colaboradores (2003), peptídeos podem ter um comprimento de até 50 aminoácidos a serem sintetizados, no entanto, a faixa ideal varia entre 6 e 18 aminoácidos. Uma propriedade importante inerente à técnica de *spot synthesis* é a sua automatização, essa característica permite a síntese precisa de centenas de peptídeos em uma única membrana e resulta na obtenção de dados em grande escala (nmol a μ mol) (Frank, 1992; Durauer, et al., 2006). Os métodos de colorimetria ou de fluorescência, como ELISA ou Immunoblotting, são técnicas que auxiliam na detecção da reatividade dos epítomos específicos que compõe a membrana. Assim, um sinal positivo restrito ao sítio ou *spot* reativo, promove sua identificação (Frank, 1992).

As técnicas executadas *in silico* para a identificação de epítomos são pouco difundidas em consequência à dificuldade de reproduzir, de forma experimental, a configuração exata dessas regiões (Van Regenmortel; Pellequer, 1994). Originalmente, a técnica de *Spot*

Synthesis foi direcionada ao mapeamento de epítomos lineares, mas foram propostas algumas adequações que permitissem a identificação de epítomos descontínuos. O mapeamento de epítomos contínuos é crucial para compreender as bases moleculares da imunogenicidade e pode ser empregado no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico, vacinas e tratamentos das mais diversas doenças que acometem os animais (Reineke, *et al.*, 1999).

O emprego do *Spot Synthesis* é cada vez mais presente no desenvolvimento de imunodiagnósticos. Faria e colaboradores (2011) ao utilizar peptídeos sintéticos, produto do mapeamento de epítomos, obtiveram resultado positivo na detecção da Leishmaniose visceral canina em animais assintomáticos, quando os kits disponíveis no mercado não foram efetivos. Já Naves (2015), na tentativa de selecionar peptídeos imunodominantes em três espécies de equídeos (equinos, asininos e muares) em relação ao vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), detectou uma mesma região imunogênica, parte do gene *env* do EIAV, o que permitiu a padronização de um ELISA indireto, que aprimorou o diagnóstico e o controle da doença.

Além da produção de imunodiagnósticos, a técnica *spot Synthesis* também é parte importante na produção de vacinas e na condução de tratamento de doenças. De-simone e colaboradores (2021), relatam que os 20 epítomos B lineares de IgG responsáveis pela neutralização da toxina diftérica mapeados em seu trabalho, foram utilizados como base para vacinas recombinantes. Os autores ainda concluem que, dessa forma, se tornaria desnecessário a realização de processo de desintoxicação dos pacientes acometidos pela Difteria e, por outro lado, reduziria o custo de produção dessa vacina. Este mesmo processo também foi efetivo em relação ao tétano em estudo posterior por De-simone e colaboradores (2023).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Retrovíroses da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG) e no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG).

4.2 AMOSTRAS DE SANGUE E SORO.

As amostras de sangue e soro utilizadas nesse estudo pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Retrovíroses (RetroLab) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, que foi registrado e aprovado pelo pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFMG 158/2024). Estas amostras são em sua totalidade de gatos domiciliados de Belo Horizonte e da região metropolitana de Belo Horizonte, coletadas em clínicas Veterinárias, estabelecimentos governamentais, abrigos e residências. De um total de 137 amostras, 16 tem histórico de vacinação utilizando vacinas inativadas (V5 Novibac, MSD) e 121 amostras não se tem informação sobre o *status* vacinal. Esse banco é composto por animais de diferentes idades e sexos. Até a realização das análises, deste estudo, as

amostras ficaram armazenadas na geladeira a 4°C, após seu uso foram acondicionadas a -20°C.

4.3 MAPEAMENTOS DE EPÍTOPOS

Com objetivo de mapear os epítomos imunodominantes das proteínas do envelope (gene *env* - acesso *Genbank*: AAC 31802.1) e do capsídeo (gene *gag* - acesso *Genbank*: AAA 43055.1) do FeLV, foi realizado no Laboratório de Genômica e Malária do ICB-UFMG a síntese de peptídeos sobre membrana de celulose, empregando a técnica de *Spot Synthesis* (Frank, 1992). Nesta síntese foram construídos 227 peptídeos com 15 aminoácidos cada, tendo como base a sequência linear das proteínas do envelope (gp70, p15E) e do capsídeo (p10, p12, p15 e p27) com sobreposição de três em três aminoácidos em cada peptídeo.

Para tanto, foi utilizado o sintetizador automático (*ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer*, *Intavis GmbH*, Köln, Alemanha), e seguiu-se o protocolo de síntese como descrito por Laune, *et al.*, (2002). Foram empregados derivados de aminoácidos associados a um grupo protetor da região N-terminal, aminoácidos-FMOC (fluorenil-metil-oxicarbonila), para construir peptídeos em pontos específicos (*spots*) na membrana. A química do grupo FMOC sustenta o acoplamento unitário de aminoácido na cadeia peptídica em formação sobre a membrana de celulose.

Visando obter uma sequência exata dos aminoácidos que irão formar os peptídeos sobre a membrana, foram realizados dois ciclos de acoplamento para cada aminoácido. O acoplamento dos aminoácidos se inicia com a remoção em meio básico do grupo FMOC utilizando 4-metilpiperidina a 25% associada a dimetilformamida (DMF), o que permite a adição do próximo aminoácido até completar a síntese total dos peptídeos. Para que não ocorram reações inespecíficas e acoplamento irregular de aminoácidos, as funções amino livres foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF. Finalizando a síntese, promoveu-se a remoção das cadeias laterais a partir da clivagem de seus grupos protetores em solução composta por ácido trifluoracético (TFA) 95% v/v, tri-isopropilsilano (TIPS) 2,5% v/v e água deionizada 2,5% v/v. A membrana foi seca, verificou-se a formação os peptídeos sob a luz UV e armazenou-se a membrana a 4°C até a realização dos ensaios imunoquímicos.

4.4 ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

Utilizando Immunoblotting, foram testadas amostras de soro sanguíneo de gatos domésticos. Em um primeiro momento a membrana, contendo os peptídeos sintéticos em análise foi sensibilizada com *pool* de soros (7 amostras) de animais com resultados negativos simultaneamente no teste imunocromatográfico (teste rápido) (FeLV SNAP FIV/FeLV Combo Test – IDEXX), e no teste molecular *nested* PCR (nPCR) amplificando a região LTR do DNA proviral do FeLV, descrita por Bande *et al* (2014) (**Quadro 2**). Em sequência, o mesmo processo foi realizado com *pool* de soros (7 amostras) composto por amostras classificadas em regressores (4 amostras) e progressores (3 amostras), seguindo a classificação das amostras apresentado no quadro 2. Este *pool* foi denominado como *pool* positivo. Esta segunda execução foi realizada para determinar as regiões mais imunogênicas das proteínas do envelope e do capsídeo viral em comparação a reatividade observada com o *pool* de soros negativos.

Quadro 2 - Classificação da fase de infecção das amostras de acordo com os resultados do teste imunocromatográfico e nPCR (proviral).

Fase de infecção	Teste diagnóstico	
	Teste imunocromatográfico	nPCR (amplificando a região gênica LTR do DNA proviral do FeLV)
Negativo/Fase abortiva	Negativo	Negativo
Fase regressiva	Negativo	Positivo
Fase progressiva	Positivo	Positivo

O immunoblotting foi realizado com o intuito de analisar a reatividade dos anticorpos aos peptídeos presentes na membrana de celulose e mapear epítomos imunodominantes das proteínas do envelope e do capsídeo do FeLV. Para tanto, foi testado um protocolo de Immunoblotting tendo como base o protocolo padronizado pelo Laboratório de Genômica e Malária do ICB/UFMG e o protocolo padronizado e descrito na tese de doutorado do Dr. João Helder Frederico de Faria Naves (2015), egresso do Laboratório de Retrovirose – RetroLab da Escola de Veterinária da UFMG. A membrana foi retirada da geladeira e foi lavada com 20 mL de solução de lavagem (tampão PBS 1x Tween 20 0,1% v/v) por 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada em 20 mL de solução de bloqueio (tampão PBS 1x, BSA 5% p/v e sacarose 4% p/v) a temperatura ambiente sob agitação por 12 a 16 horas.

Após esse período, a membrana foi lavada com 80 mL de solução de lavagem, sob agitação por duas vezes de 10 minutos a temperatura ambiente e incubada com solução contendo, em experimentos independentes, os *pools* de soros positivos ou negativos diluídos 1:1000 na solução de lavagem acrescida de BSA 1% p/v, sob agitação rápida (600 rpm, agitação linear) em temperatura ambiente. Posteriormente, após três ciclos de lavagem, a membrana foi incubada com conjugado anti-cat IgG (Fc specific) marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, SAB3700059) diluídos 1:10.000 na solução de lavagem, por uma hora a temperatura ambiente sob agitação lenta.

Para avaliar a reatividade dos *spots*, foi feita uma análise sobre a intensidade dos peptídeos sintetizados em membrana utilizando, para isso, a técnica de quimioluminescência, onde se cobre a membrana imunosensibilizadas com o reagente Luminata Forte (Luminata Forte Western HRP substrate, Merck Millipore, EUA) conforme instruções do fabricante. Em seguida, para leitura do resultado dessa técnica, foi feito uma fotodocumentação utilizando o

equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, EUA). Para tanto, deve-se configurar o software que controla a máquina da seguinte forma: seleciona-se, o modo *increment* no campo *exposure type*, *standard* no campo *sensitivity/resolution*, *chemiluminescence* em *methods*, 3 em *tray position*, tempo de exposição (foi revelado em intervalos de 10 em 10 segundos, 30 em 30 segundos e 60 em 60 segundos) e para cada tempo de exposição seleciona-se, por fim, a quantidade de posições desejada (foram fotodocumentadas 6 posições por tempo).

Ao fim de cada ensaio imunoquímico, a membrana foi regenerada, como forma de tratamento desta para uso subsequente. Para isso, lavou-se a membrana sob agitação por três vezes em período de 10 minutos cada com DMF e em seguida, a membrana foi incubada com 100 mL de solução desnaturante (uréia 8M e SDS 1% p/v em água mili-Q) sob agitação moderada, em temperatura ambiente por 12 a 16 horas. No dia seguinte a membrana foi lavada por mais duas vezes com solução desnaturante por 30 minutos cada; lavada por 2 minutos com 150 mL de água mili-Q; lavada três vezes com solução ácida (55% v/v etanol, 35% água mili-Q, 10% v/v ácido acético glacial) por 10 minutos cada; lavada por 2 minutos com 150mL de água mili-Q; lavada por duas vezes de 5 minutos cada com 50 mL de etanol. Em seguida a membrana foi secada sob fluxo laminar. A mesma foi armazenada a 4°C. Todas as incubações realizadas foram feitas sob agitação rápida, normalmente, a 600 rpm.

4.5 SELEÇÃO DE EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES POR BIOINFORMÁTICA

A seleção dos prováveis epítopos imunodominantes para a posterior síntese de peptídeos solúveis foi realizada a partir do resultado dos ensaios imunoquímicos. As imagens obtidas como produto da fotodocumentação foram tratadas a partir do programa *Image J* (*Image J* 1.54d; Java 1.8.0_345 [64-bit] - *Image Processing and Analysis in Java*), associado ao *plug-in Protein array analyser*, segundo protocolo padronizado pelo Laboratório de Malária e Genômica do ICB/UFGM. A partir do protocolo, foram configurados os parâmetros para o tratamento da imagem da membrana onde se define o tamanho do *spot* e o tamanho da membrana, a escala de cores (da mais fria para a mais quente preto/roxo para amarelo/branco, estabelecida como configuração ideal pela padronização) e a frequência dessas cores. Essa configuração permite a leitura adequada da membrana pelo programa e assim a obtenção dos valores de densitometria. Em seguida, os valores de densitometria obtidos como resultados foram analisados a partir do programa da Microsoft®, *Microsoft office Excel*, onde, calculou-se a média e o desvio padrão dos valores de densitometria das amostras negativas para a obtenção do *cutoff* capaz de diferenciar as amostras positivas das amostras negativas (**Quadro 3**). Com base neste *cutoff* foram selecionados os peptídeos mais imunodominantes, a serem sintetizados e, futuramente, usados como antígeno em um ELISA indireto para FeLV.

Quadro 3 – Cálculo do *cutoff* para seleção dos peptídeos imunodominantes.

1º Em uma primeira aba, ordena-se dos menores para os maiores valores de densitometria, tanto da densitometria dos resultados do immunoblotting com soros positivos e soros negativos;

2º Calcula-se as médias dos quatro menores valores referente a cada uma. Nesse passo, o objetivo é retirar a cor de fundo de cada membrana para normalização dos valores de densitometria entre as membranas e, assim, fazer uma comparação mais adequada;

3º Na próxima aba finalizamos o cálculo do *cutoff* para que possamos realizar a seleção dos peptídeos mais imunodominantes. Para isso:

a) Calculou-se a média do valor total da densitometria de cada um dos *spots* (positivos e negativos), retirando o valor da média calculada para eliminar a cor de fundo da membrana

a.1) Valor da densitometria do *spot* negativo – valor da média dos quatro menores valores de densitometria negativo

a.2) Valor da densitometria do *spot* positivo – valor da média dos quatro menores valores de densitometria positivo

b) Calculou-se a média dos resultados do cálculo a.1 de cada *spot* (valores de densitometria da sensibilização com soros negativos no immunoblotting);

=MÉDIA (G2:G231)

c) Calculou-se o desvio padrão a partir dos resultados de a.1 de cada *spot* (valores de densitometria da sensibilização com soros negativos no immunoblotting);

=DESVPAD.A(G2:G231)

d) A partir dos cálculos anteriores foi estabelecido o *cutoff*, e assim foram selecionados os peptídeos mais reativos.

Cutoff = Média dos negativos (resultado da etapa b) + 2 x desvio padrão (resultado da etapa c)

4.6 SÍNTESE SOLÚVEL DE PEPTÍDEOS

Após a seleção dos peptídeos mais reativos, estes foram sintetizados pelo Laboratório de Genômica e Malária do ICB-UFMG tendo como base o método criado por Merrifield em 1969, utilizando para isso um sintetizador automático (ResPepSL/Automatic Spot Synthesizer, Intavis GmbH, Colônia, Alemanha) (Gausepohl et al., 1992). O processo se desenvolve a partir da fixação do aminoácido C-terminal do peptídeo em um suporte sólido insolúvel, seguida pela adição sequencial de resíduos para alongar a cadeia peptídica. Para evitar reações adversas, os aminoácidos foram protegidos pelo grupo FMOC em sua função amina e em sua cadeia lateral. Como suporte sólido, para acoplamento das sequências de aminoácidos, foi utilizado a resina H-Rink Amide Chemmatrix (Sigma-Aldrich) protegida por grupamentos FMOC.

Para a síntese foi utilizada um tubo contendo a resina e este foi lavado três vezes com 1 mL de DMF, posteriormente foi adicionada 4-metilpiperidina a 25% para remover os grupos FMOC da resina, para isso, ficando incubado por 20 minutos sob agitação. Antes de iniciar o acoplamento das sequências de aminoácidos, foram feitas mais três lavagens com DMF. Na fase de acoplamento, o primeiro aminoácido foi acoplado associado com os ativadores da função carboxila, Oxyma Pure (Merck) (100 μ M) e diisopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich) (100 μ M) em agitação por 30 minutos. Em sequência, foram realizadas três lavagens com DMF, para assim, iniciar novamente a etapa de desproteção do aminoácido já acoplado.

Após três lavagens com DMF, foi iniciado o protocolo de acoplamento do segundo aminoácido. Até que todos os aminoácidos do peptídeo em síntese fossem acoplados esse ciclo de desproteção/acoplamento foi repetido da mesma forma. Com o término do processo, após o acoplamento do último aminoácido, promoveu-se a remoção do peptídeo da resina, por meio de uma etapa de clivagem, onde também foram retirados os grupos protetores das cadeias laterais. O peptídeo em composição foi tratado, então, por três horas sob agitação em uma solução de clivagem contendo 2,5% de beta-mercaptoetanol, 2,5% de água destilada e 2,5% de triisopropilsilano em ácido trifluoroacético 92,5%. Promoveu-se então a filtração e precipitação dessa solução em éter metil-terc-butilico resfriado e em seguida foi liofilizado, obtendo-se assim o peptídeo a ser usado, posteriormente, em ELISA indireto para FeLV. Para a síntese de cada peptídeo selecionado no *spot synthesis* foi repetido o procedimento descrito acima.

4.7 PADRONIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO

A partir dos peptídeos solúveis selecionados pela técnica de *Spot Synthesis* foi feita a padronização de ELISA indireto. No sentido de confirmar a reatividade e especificidade dos peptídeos sintéticos, o teste de ELISA indireto foi executado com soro de gatos naturalmente infectados (teste imunocromatográfico e PCR positivos) e não infectados (teste imunocromatográfico e PCR negativos) por FeLV.

Inicialmente foram testados os mesmos *pool's* utilizados na fase dos ensaios imunoquímicos. Como antígeno foram utilizados os peptídeos selecionados ao longo desse projeto (F1 a F9). Foram testados 3 tipos de placas de ELISA de 96 cavidades: placa de poliestireno Maxisorp Nunc (Thermo Scientific™), placa do tipo *medium binding* (Costar® EIA/RIA Plate, 96well, No Lid Flat Botton, Medium Binding, Non-Sterile, Polystyrene) e

placa do tipo *high binding* (Costar® EIA/RIA Plate, 96well, No Lid Flat Botton, High Binding, Non-Sterile, Polystyrene).

Primeiramente, o peptídeo liofilizado foi solubilizado em água mili-Q (2 mL). Os peptídeos (F1 a F9) foram analisados nas concentrações 0,25 µg/well/100µL, 0,5 µg/well/100µL 1 µg/well/100µL e 2 µg/well/100µL, em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Foram testadas duas temperaturas de incubação, 4°C armazenando a placa em um refrigerador e a 37°C armazenando a placa em uma estufa, em todas as etapas do ELISA com exceção da incubação do substrato, que sempre foi feita em temperatura ambiente. Foram avaliadas algumas diluições de soros nas seguintes diluições em PBS Tween 20 com leite em pó desnatado a 1% – em série 1:4 a 1:512, 1:8 a 1:1024, 1:10 a 1:80, 1:50 e 1:100 e, uma única diluição, 1:50, sempre em duplicatas para cada amostra. Durante toda a padronização sempre foi utilizado o conjugado anti-cat IgG (Fc specific) marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, SAB3700059) diluídos 1:10.000 em PBS Tween 20 com leite em pó desnatado a 1%, assim como, a solução de bloqueio a 5% (PBS Tween 20 com leite em pó 5%) e a solução de lavagem a 0,01% (PBS – Tween 20 0,01%). Na solução do substrato, foi testado o o-fenilenodiamina (OPD) nas concentrações de 5mg/mL e 20mg/mL, mantendo o restante da formulação do substrato, 10mL de tampão fosfato citrato pH 5,0; 0,02% de H₂O₂ 30% 100 volumes. Como solução de parada foi utilizada ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Para a leitura da placa os comprimentos de onda de 490 e 492 nm empregados dependeram do modelo do leitor de placas de ELISA utilizado.

Foi realizado, posteriormente, o ELISA indireto, com amostras individuais de gatos naturalmente infectados e não infectados por FeLV (**Quadro 2**), testados pelos testes imunocromatográfico (TI) (FIV Ac/FeLV Ag combo VET FEST Bioclin Vet) e PCR convencional da região U3-LTR (provírus). Em todas as placas foram utilizados controle positivo e negativo compostos por *pool's* de soros, seguindo o mesmo padrão de classificação das amostras a serem testadas no ELISA descrito acima, e branco em duplicata. Para melhor avaliação do resultado deste ELISA indireto, no presente estudo, esses resultados foram divididos em dois grupos: grupo de gatos positivos para TI e PCR e grupo de gatos negativos para TI e PCR.

4.8 NORMATIZAÇÕES DE VALORES

Nos testes pós padronização do ELISA indireto, como algumas amostras foram avaliadas em mais de uma placa de ELISA foi necessário realizar a normatização dos valores de DO para eliminar a variação desses dados entre placas e assim obter um resultado mais adequado sobre a detecção de anticorpos do FeLV. Estas amostras foram testadas mais de uma vez para reavaliar o comportamento do resultado que, no primeiro momento, apresentaram valores de DO discrepantes em relação aos demais resultados.

Para realizar a normatização de valores, primeiramente, faz-se a média da duplicata da absorbância de cada amostra de cada placa, a média da duplicata da absorbância do controle de cada placa e a média global da absorbância do controle de todas as placas. Em seguida, calcula-se o valor normatizado de cada amostra (**Quadro 4**). Este cálculo, deve ser feito individualmente para cada uma das leituras das placas de ELISA avaliadas no experimento. Neste estudo, estabeleceu-se um limite de 20% de variação entre as leituras dos controles das placas e entre leituras de uma mesma amostra testada em placas e dias diferentes.

Quadro 4 – Cálculo para normatização de valores de absorbância obtidos no ELISA indireto para FeLV.

$\frac{\text{Média da absorbância de cada amostra} \times \text{Média global da absorbância dos controles das placas}}{\text{Média da absorbância do controle de cada placa}}$
--

5 RESULTADOS

5.1 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS E ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

Na síntese de peptídeos sobre a membrana de celulose (*Spot Synthesis*) foram sintetizados 227 peptídeos, cada um contendo 15 aminoácidos tendo como base a sequência linear das proteínas do envelope (gp70, p15E) e do capsídeo (p10, p12, p15, p27) do FeLV. Para que toda a sequência de aminoácidos que compõem essas proteínas fosse percorrida, fez-se, em cada peptídeo, uma sobreposição de cinco em cinco aminoácidos. As sequências de cada um dos *spots* sintetizados na membrana de celulose e os peptídeos utilizados como antígeno na padronização do ELISA indireto, estão descritos e destacados no anexo 1.

Para realizar o mapeamento de epítomos imunodominantes das proteínas supracitadas, através do ensaio imunoquímico, foi utilizado a diluição 1:1.000 para soros e 1:10.000 para o conjugado. A membrana, então, foi sensibilizada com pool de soros negativos, e como resultado foram observados *spots* não reativos, o que era esperado, inicialmente, na totalidade dos *spots* (**Figura 6**). Os soros do *pool* de negativos (7 amostras), que permitem a realização dessa primeira fase do mapeamento de epítomos, são de gatos em sua maioria machos e que residem na cidade de Belo Horizonte e região metropolitana. No entanto, não se tem conhecimento sobre o *status* vacinal desses animais.

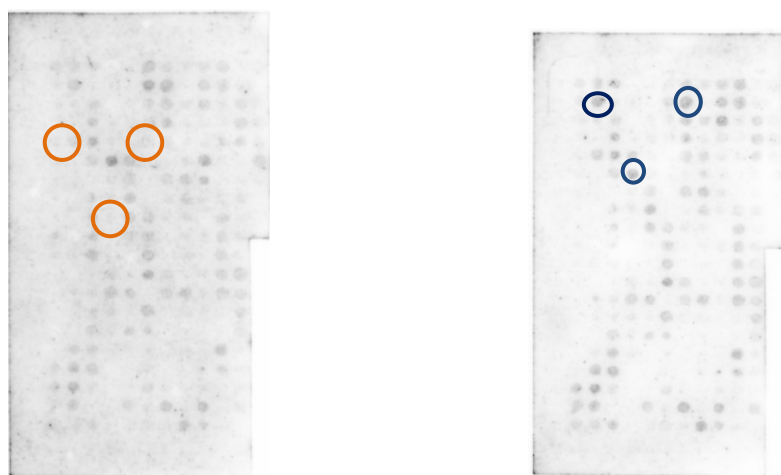
A - *Pool* de soros negativosB- *Pool* de soros positivos

Figura 6: Membrana de celulose sintetizada: A - com *pool* de soros negativos (*spot Synthesis*), onde pode ser visto a ocorrência de *spots* não reativos (circulados de laranja); B - com *pool* de soros positivos (*spot Synthesis*), onde pode ser visto a ocorrência de *spots* reativos (circulados de azul) (arquivo pessoal).

Em sequência, foi testado o mesmo protocolo, imunossensibilizando a membrana com *pool* de soros positivos com objetivo de determinar as regiões mais imunogênicas das proteínas do gene *env* e *gag* do FeLV em relação à espécie felina. Nesta segunda fase, os soros do *pool* de positivos (7 amostras) são de gatos que residem na cidade de Belo Horizonte e região metropolitana e, em sua maioria, são machos e não se tem dados sobre a realização do protocolo vacinal para o FeLV. Regiões imunogênicas se mostraram reativas, cor do *spot* mais escura (preta), tanto para as proteínas do gene *env* quanto para as proteínas do gene *gag* do FeLV. (**Figura 6**)

5.2 SELEÇÃO DE EPÍTOPOS IMUNODOMINANTES POR BIOINFORMÁTICA

A partir do mapeamento de epítomos (immunoblotting), e tendo como recurso as técnicas de bioinformática, no presente estudo foram selecionados os epítomos imunodominantes a serem sintetizados, na sua forma solúvel, para execução das próximas etapas do projeto. Com o tratamento das imagens fotodocumentadas utilizando o programa *Image J*, mediante as duas sensibilizações da membrana (*pool* de soros positivos e negativos), obtiveram-se os valores de densitometria de cada *spot*, e a imagem dos *spots* em escalas de cores, das mais frias para as mais quentes (preto/roxo para o amarelo/branco), que possibilitam uma fácil e prática visualização da reatividade de cada *spot* (**Figura 7**). Os valores de densitometria são ofertados pelo programa tabulados, normalizados e organizados em linhas e colunas mediante o mapa da membrana de celulose analisada. Esta disposição facilita a identificação do peptídeo a ser sintetizado posteriormente (**Tabela 3**). Nesse sentido, é válido ressaltar que, a partir da execução do immunoblotting, houve uma efetiva diferenciação entre soros positivos e negativos, o que como consequência permitiu a seleção de peptídeos imunodominantes.

Tabela 3 – Valores de densitometria obtidos a partir do tratamento, utilizando o programa *Image J*, da imagem fotodocumentada após o mapeamento de epítomos e os ensaios imunológicos.

A

Nome do ensaio	Lin./Col.	C1*	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
FELV NEG	L1**	5538	6136	8539	1684	3855	10577	4747	3038	4472	4811	1377	2043
FELV NEG	L2	2609	10396	1987	2557	2693	16013	13049	1799	6962	6102	2741	711
FELV NEG	L3	1897	2856	5230	1186	2713	5281	7810	3403	7039	2568	4227	1460
FELV NEG	L4	3054	2096	7201	2588	2936	5889	8731	2316	2007	1570	6637	2707
FELV NEG	L5	2625	6588	11924	2828	2051	4555	4360	1762	1946	5294	5465	3135
FELV NEG	L6	2508	1712	6030	20842	9507	3481	1876	3490	15733	1771	1170	8813
FELV NEG	L7	1613	2161	1837	2951	6947	1770	5815	8441	8509	1741	1826	1644
FELV NEG	L8	1993	1617	5571	3846	9449	1510	3375	7181	3217	3304	3761	672
FELV NEG	L9	1964	2345	6649	2989	7496	7488	3259	3861	1450	6496	1794	913
FELV NEG	L10	4770	1684	7433	1632	5171	8151	2112	3095	3073	5647	3771	7343
FELV NEG	L11	2917	3229	11373	3320	1913	10635	2065	3471	1502	5769	1962	50
FELV NEG	L12	1621	1247	2010	6529	2783	13312	4899	2221	3092	6195	7917	19
FELV NEG	L13	1336	3244	3697	10070	6929	1448	6086	9587	2713	6896	4802	33
FELV NEG	L14	1461	1966	5066	4234	1652	10254	2061	3446	2270	1493	5606	54
FELV NEG	L15	1378	1690	5821	2730	5820	5477	1884	1829	1456	1089	3491	101
FELV NEG	L16	1329	6017	5671	2163	2342	2371	2538	3324	1810	10306	1187	467
FELV NEG	L17	4249	9000	7468	931	1426	3658	1112	2245	4317	5109	1566	229
FELV NEG	L18	6290	12544	2776	1279	1547	5001	2656	2428	3063	1598	1658	543
FELV NEG	L19	4503	7203	2251	1957	4845	3259	9798	3470	10628	1324	2600	319
FELV NEG	L20	8190	3501	5135	2218	2284	3868	2755	10608	5332	1838	559	290

B

Nome do ensaio	Lin./Col.	C1*	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
FELV POS	L1**	3515	6931	11199	959	1292	2283	6932	3590	7156	10965	955	2426
FELV POS	L2	3235	17219	2338	1731	1458	5297	16986	1231	12280	11554	2010	667
FELV POS	L3	2494	3218	5067	566	1643	2585	9890	5384	16822	2861	5921	1251
FELV POS	L4	2651	1136	10311	1673	1939	1921	8730	2432	3691	1278	6960	3474
FELV POS	L5	1803	8274	12002	7360	1112	630	5306	5886	2142	1605	5203	1041
FELV POS	L6	1281	798	5662	14405	1552	714	1229	3948	1522	653	772	657
FELV POS	L7	862	903	959	1394	4798	617	6733	9678	2788	578	689	308
FELV POS	L8	859	511	3965	2840	11764	633	1223	5914	1982	3409	2331	151
FELV POS	L9	1319	548	3483	975	8007	4943	2270	1595	411	6992	767	170
FELV POS	L10	1406	627	1785	207	782	6305	774	1341	1685	6988	2194	4273
FELV POS	L11	823	1268	1260	621	651	8171	549	912	596	7044	2353	387
FELV POS	L12	1115	428	729	2940	920	14302	5023	781	991	6766	6740	546
FELV POS	L13	880	3167	2598	7919	8245	753	4849	9463	1164	10585	5085	641
FELV POS	L14	944	1366	2223	2542	1175	9405	1414	1537	593	959	6404	1094
FELV POS	L15	601	619	5727	1945	4470	3972	821	1061	511	769	4337	833
FELV POS	L16	609	1974	8887	1428	562	1433	664	1132	788	13592	1458	1050
FELV POS	L17	1358	10547	12946	322	587	1223	585	1715	3524	7000	1617	924
FELV POS	L18	9270	16151	3359	664	596	3945	1172	731	1803	1486	608	469
FELV POS	L19	8441	10212	1335	895	5851	1967	14622	1339	10675	927	4905	192
FELV POS	L20	5720	4865	8469	1091	1306	3515	2247	15540	5741	1854	769	1101

Valores de densitometria referente a sensibilização da membrana com *pool* de soros negativos (FeLV NEG) - A e Valores de densitometria referente a sensibilização da membrana com *pool* de soros positivos (FeLV POS) – B. *Colunas de acordo com o número de colunas da membrana. ** Linhas de acordo com o número de linhas da membrana.

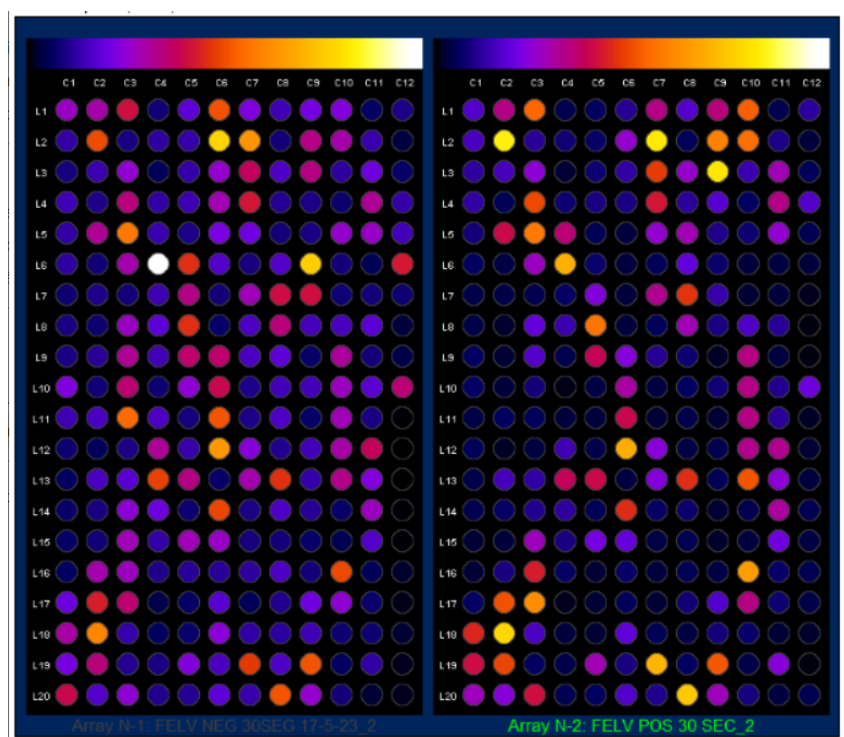


Figura 7 – Imagem dos *spots* em escala de cores (mais frias para as mais quentes) como forma de visualizar a reatividade de cada *spot*, obtida a partir do tratamento, pelo programa *Image J*, da fotodocumentação do resultado dos ensaios imunoquímicos. A esquerda da figura observa-se o resultado da sensibilização da membrana com *pool* de soros negativos e a direita com *pool* de soros positivos (arquivo pessoal).

Em seguida, os valores de densitometria obtidos foram analisados a partir do programa *Microsoft Office Excel* e, com o estabelecimento de um *cutoff* ($cutoff = 9934,382$), foram selecionados 16 peptídeos possíveis de serem sintetizados e utilizados na próxima etapa do projeto, padronização de um ELISA indireto com peptídeos sintéticos adsorvidos na placa como antígeno (**Tabela 4**). Estes peptídeos se localizam na região gênica dos genes *env* e *gag* do FeLV (**Tabela 7**). O cálculo do *cutoff* se baseia na fórmula descrita no quadro 3 dessa dissertação.

Tabela 4 – Peptídeos selecionados a partir de um *cutoff* (*cutoff* = 9934,382) (**Quadro 3**) estabelecido tendo como base os valores de densitometria obtidos a partir do tratamento da fotodocumentação dos resultados dos ensaios imunológicos.

Posição na membrana	Posição no <i>Image J</i>	Sequencia de aminoácidos	Peso molecular	<i>Pool</i> Negativos	<i>Pool</i> Positivos	POS/CN
C09	L3/C9	A-S-P-I-A-S-R-L-R-E-R-R-E-N-P	1750.944497	6325,25	16613	2,62645
A10	L1/C10	Q-R-V-L-L-E-A-R-K-Q-V-P-G-E-D	1736.942768	4097,25	10756	2,62517
B10	L2/C10	E-A-R-K-Q-V-P-G-E-D-G-R-P-T-Q	1666.828132	5388,25	11345	2,1055
B09	L2/C9	P-R-T-P-T- A-S-P-I-A-S-R-L-R-E	1650.905986	6248,25	12071	1,9319
Q03	L17/C3	P-K-R-I-G-T-G-D-R-L-I-N-L-V-Q	1678.973673	6754,25	12737	1,88577
B02	L2/C2	Y-G-C-K-T-T-D-R-K-K-Q-Q-T-Y	1846.889018	9682,25	17010	1,75682
M10	L13/C10	A-A-R-R-P-T-N-L-A-Q-V-K-Q-V-V	1649.958358	6182,25	10376	1,67827
S07	L19/C7	F-S-L-D-S-I-S-Q-V-E-K-K-I-F-A	1710.908672	9084,25	14413	1,58659
D03	L4/C3	Y-D-P-I-A-L-F-T-V-S-R-Q-V-S-T	1695.872621	6487,25	10102	1,5572
T08	L20/C8	P-G-G-H-G-P-P-P-S-G-P-R-T-P-T	1410.689847	9894,25	15331	1,54948
S02	L19/C2	Q-F-T-Q-K-G-R-Q-A-S-W-D-G-P-K	1732.853953	6489,25	10003	1,54147
A03	L1/C3	W-D-G-P-K-M-W-G-L-R-L-Y-R-T-G	1834.919530	7825,25	10990	1,40442
P10	L16/C10	Q-G-K-E-E-T-P-A-A-F-L-E-R-L-K	1715.91007	9592,25	13383	1,39518
H05	L8/C5	H-F-A-K-A-V-R-F-R-R-E-P-I-S-L	1826.032191	8735,25	11555	1,3228
Q02	L17/C2	C-E-G-K-C-N-P-L-V-L-Q-F-T-Q-K	1706.837834	8286,25	10388	1,25364
S09	L19/C9	L-Q-A-L-L-T-G-E-E-R-Q-R-V-L-L	1737.999554	9914,25	10466	1,05565

Tendo como objetivo confirmar os peptídeos selecionados e, se possível, selecionar novos peptídeos, foi executado o mesmo protocolo desde o mapeamento de epítomos aos ensaios imunoquímicos e da fotodocumentação ao processo de seleção dos peptídeos. Após o tratamento das imagens fotodocumentadas no *Image J*, obtiveram-se, no presente estudo, os seguintes valores de densitometria (**Tabela 5**), a imagem dos *spots* em escalas de cores (**Figura 8**) e a partir dos valores de densitometria analisados, foi estabelecido um *cutoff* (*cutoff* = 16561), que proporcionou a seleção de 15 peptídeos possíveis de serem sintetizados (**Tabela 6**) e que poderão ser utilizados como descrito acima, em um ELISA indireto. Estes peptídeos, também, pertencem a região gênica dos genes *env* e *gag* do FeLV (**Tabela 7**).

Tabela 5 - Valores de densitometria obtidos a partir do tratamento, utilizando o programa *Image J*, da imagem fotodocumentada após o mapeamento de epítomos e os ensaios imunquímicos. Valores de densitometria referente a sensibilização da membrana com *pool* de soros negativos (FeLV NEG) - **A** e *pool* de soros positivos (FeLV POS) – **B**. *Colunas de acordo com o número de colunas da membrana. ** Linhas de acordo com o número de linhas da membrana.

A

Nome do ensaio	Lin./Col.	C1*	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
FeLV NEG	L1**	6454	7581	6949	3502	5758	4328	4656	3470	6011	6735	3143	2314
FeLV NEG	L2	2722	10846	2719	3288	5818	6321	12677	2914	8977	7082	4798	821
FeLV NEG	L3	5970	4470	9548	19748	7470	16428	7946	4981	18046	5256	7425	2114
FeLV NEG	L4	2053	3666	20280	20804	6668	8844	16845	2681	7742	6150	10753	2606
FeLV NEG	L5	5658	7615	19677	45497	2908	5754	6998	8849	4246	14323	10180	5866
FeLV NEG	L6	3851	3942	12710	21367	6712	5975	2469	4135	32716	3986	6726	8511
FeLV NEG	L7	3325	3599	4114	5302	8542	4332	5903	5892	13156	3193	9066	1578
FeLV NEG	L8	3917	3942	6902	6154	16379	2908	3825	4339	1734	2816	3605	793
FeLV NEG	L9	2848	3268	9366	5931	18850	8205	5324	2896	1368	4982	2315	1726
FeLV NEG	L10	9040	3499	13015	3039	13937	10017	2994	3506	2853	5658	5073	9982
FeLV NEG	L11	5330	5635	16297	6776	4924	11951	2839	7976	1551	4279	6324	90
FeLV NEG	L12	3295	2389	3384	8548	5947	19223	3749	3606	3357	6613	12380	99
FeLV NEG	L13	3951	6713	6924	13294	8943	2965	6030	12847	2740	6559	11012	116
FeLV NEG	L14	2805	4540	9296	5998	4028	11343	3376	4200	3778	3224	8817	92
FeLV NEG	L15	2931	3322	9719	4641	12134	9263	2839	3464	2762	2430	6559	100
FeLV NEG	L16	4498	5024	12780	5353	4382	5107	5678	9251	4666	12931	3980	39
FeLV NEG	L17	4215	13318	13473	2136	4317	11974	3232	4982	7566	6488	8629	133
FeLV NEG	L18	8588	20420	5785	3059	4404	14137	5938	5071	6733	3074	6647	307
FeLV NEG	L19	8224	10393	3955	4297	9240	10175	15241	6598	12010	5008	10506	100
FeLV NEG	L20	8730	5654	8541	5804	6613	7412	6347	16116	6442	4009	5939	102

B

Nome do ensaio	Lin./Col.	C1*	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
FeLV POS	L1**	11685	7186	10314	2024	5162	4749	5919	2859	9486	10251	4127	4839
FeLV POS	L2	1529	15353	1741	2142	4996	8416	19516	2295	13570	10758	5055	1173
FeLV POS	L3	3700	5280	11348	2319	4686	27060	9239	5586	24958	5227	16481	4077
FeLV POS	L4	6924	3948	15052	4376	4142	16628	14546	2668	11277	22123	17111	3897
FeLV POS	L5	7198	6967	20170	15541	3422	5701	7432	8081	5111	49340	21966	5931
FeLV POS	L6	3194	2518	10626	33343	6866	5269	1288	5299	9977	22730	18133	13961
FeLV POS	L7	3043	2465	1938	10334	9730	4677	6775	11736	8212	4114	63370	2750
FeLV POS	L8	3016	2820	6156	4328	19262	1846	4853	6961	5010	2235	7652	1675
FeLV POS	L9	1582	1596	9632	2386	21661	6034	13222	5992	822	9926	6191	3624
FeLV POS	L10	13324	1765	11599	2128	12810	10812	2272	4393	2910	6779	6599	8453
FeLV POS	L11	3459	4957	19490	4147	3042	13809	1684	4051	1011	8276	5964	153
FeLV POS	L12	2709	877	1614	5570	4799	28303	3332	2165	3897	10706	10879	118
FeLV POS	L13	1960	3741	3904	10887	13359	1360	6393	10016	3684	8157	8408	150
FeLV POS	L14	3081	2260	9144	4379	2747	20438	2312	4108	2589	6389	6246	208
FeLV POS	L15	2238	1619	9191	2254	12050	11128	5304	1857	1493	1663	3166	241
FeLV POS	L16	5714	2672	15369	9265	2168	5949	3107	3490	4062	21231	1801	196
FeLV POS	L17	3943	21309	13124	7660	2833	13615	7587	4394	8639	20917	5470	255
FeLV POS	L18	14153	26906	7272	5008	3321	15154	8633	3941	6059	3553	3961	274
FeLV POS	L19	8137	9103	5415	3837	14276	11024	20139	10200	19090	5241	10442	204
FeLV POS	L20	13267	6646	6192	2858	8225	4884	7683	22159	15898	5066	4565	239

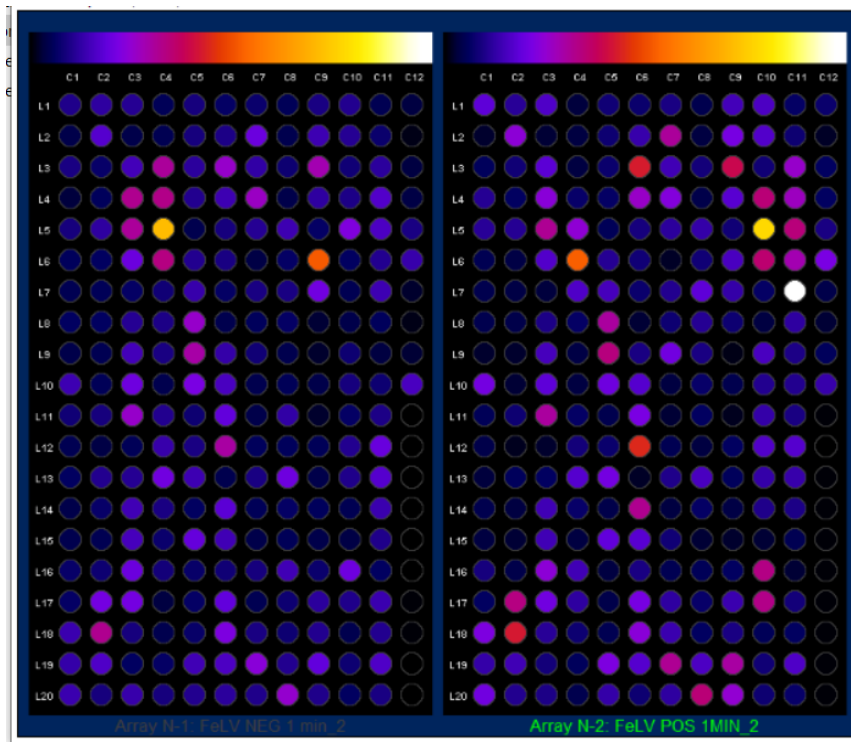


Figura 8 – Imagem dos *spots* em escala de cores (mais frias para as mais quentes) como forma de visualizar a reatividade de cada *spot*, obtida a partir do tratamento, pelo programa *Image J*, da fotodocumentação do resultado dos ensaios imunológicos. A esquerda da figura observa-se o resultado da sensibilização da membrana com *pool* de soros negativos e a direita com *pool* de soros positivos (arquivo pessoal)

Tabela 6 - Peptídeos selecionados a partir de um *cutoff* (*cutoff* = 16561) (**Quadro 3**) tendo como base os valores de densitometria obtidos a partir do tratamento da fotodocumentação dos resultados dos ensaios imunológicos.

Posição na membrana	Posição no <i>Image J</i>	Sequencia de aminoácidos	Peso molecular	<i>Pool</i> Negativos	<i>Pool</i> Positivos	POS/CN
G11	L7/C11	G-L-Q-G-F-T-L-S-D-L-L-K-E-A-E	1619.830088	7932,75	62399,25	7,86603
D10	L4/C10	G-R-P-T-Q-L-P-N-V-I-D-E-T-F-P	1682.852220	5016,75	21152,25	4,216325
Q10	L17/C10	T-P-A-A-F-L-E-R-L-K-E-A-Y-R-M	1794.934511	5354,75	19946,25	3,724964
E10	L5/C10	L-P-N-V-I-D-E-T-F-P-L-T-R-P-N	1724.899169	13189,75	48369,25	3,667185
F11	L6/C11	L-Q-R-L-E-G-L-Q-G-F-T-L-S-D-L	1688.899171	5592,75	17162,25	3,06866
E11	L5/C11	D-I-R-N-K- L-Q-R-L-E-G-L-Q-G-F	1785.974402	9046,75	20995,25	2,320751
N06	L14/C6	F-D-S-Q-Q-G-W-F-E-G-W-F-N-K-S	1861.795434	10209,75	19467,25	1,906731
P10	L16/C10	Q-G-K-E-E-T-P-A-A-F-L-E-R-L-K	1715.910070	11797,75	20260,25	1,717298
C06	L3/C6	E-V-V-L-Q-N-R-R-G-L-D-I-L-F-L	1784.020289	15294,75	26089,25	1,705765
Q02	L17/C2	C-E-G-K-C-N-P-L-V-L-Q-F-T-Q-K	1706.837834	12184,75	20338,25	1,669156
S09	L19/C9	L-Q-A-L-L-T-G-E-E-R-Q-R-V-L-L	1737.999554	10876,75	18119,25	1,66587
T08	L20/C8	P-G-G-H-G-P-P-P-S-G-P-R-T-P-T	1410.689847	14982,75	21188,25	1,414176
S07	L19/C7	F-S-L-D-S-I-S-Q-V-E-K-K-I-F-A	1710.908672	14107,75	19168,25	1,358704
K03	L11/C3	R-Q-S-Q-T-G-S-K-V-A-T-Q-R-P-Q	1670.870665	15163,75	18519,25	1,221284
H05	L8/C5	H-F-A-K-A-V-R-F-R-R-E-P-I-S-L	1826.032191	15245,75	18291,25	1,199761

Dos 31 peptídeos selecionados nos dois ensaios imunológicos 19 estão dentro da região das proteínas p12, p15 e p30 do capsídeo e 12 dentro da região das proteínas gp70 e p15E do envelope viral. Esta identificação das proteínas correspondentes aos peptídeos selecionados só é possível, pois ao se produzir a membrana de celulose, o *software* que controla a máquina que executa o *spot synthesis*, também, fornece dados como a localização na membrana, a sequência de aminoácidos e o peso molecular de cada *spot*, que podem ser utilizados ao fim do processo para identificar o peptídeo selecionado. Assim, a partir de uma consulta ao *GenBank*, utilizando as sequências de aminoácidos empregadas para construir a membrana (proteínas do envelope e do capsídeo do FeLV), tem-se a informação das regiões de cada uma das proteínas do vírus. Com todas essas informações, basta identificar a sequência de aminoácidos de cada peptídeo selecionado nas regiões dos genes *env* e *gag*. Entre os mais imunodominantes, os peptídeos derivados do gene *gag* predominaram neste estudo (**Tabela 7**). Comparando o primeiro imunoblotting, realizado, com o segundo, foram confirmadas as seleções de 6 peptídeos (Q02, H05, S07, T08, S09, P10), e foram selecionados 9 novos peptídeos (G11, D10, Q10, E10, F11, E11, N06, C06, K03).

Tabela 7 – Relação de peptídeos selecionados que pertencem ao gene *env* e ao gene *gag* do FeLV, mostrando os mais imunodominantes.

A

Peptídeo selecionado	POS/CN	Pertence ao gene <i>env</i> ou <i>gag</i>
C09	2,62645	<i>gag</i>
A10	2,62517	<i>gag</i>
B10	2,1055	<i>gag</i>
B09	1,9319	<i>gag</i>
Q03	1,88577	<i>env</i>
B02	1,75682	<i>env</i>
M10	1,67827	<i>gag</i>
S07	1,58659	<i>gag</i>
D03	1,5572	<i>env</i>
T08	1,54948	<i>gag</i>
S02	1,54147	<i>env</i>
A03	1,40442	<i>env</i>
P10	1,39518	<i>gag</i>
H05	1,3228	<i>env</i>
Q02	1,25364	<i>env</i>
S09	1,05565	<i>gag</i>

B

Peptídeo selecionado	POS/CN	Pertence ao gene <i>env</i> ou <i>gag</i>
G11	7,86603	<i>gag</i>
D10	4,216325	<i>gag</i>
Q10	3,724964	<i>gag</i>
E10	3,667185	<i>gag</i>
F11	3,06866	<i>gag</i>
E11	2,320751	<i>gag</i>
N06	1,906731	<i>env</i>
P10	1,717298	<i>gag</i>
C06	1,705765	<i>env</i>
Q02	1,669156	<i>env</i>
S09	1,66587	<i>gag</i>
T08	1,414176	<i>gag</i>
S07	1,358704	<i>gag</i>
K03	1,221284	<i>env</i>
H05	1,199761	<i>env</i>

A – primeira seleção de peptídeos; **B** – segunda seleção de peptídeos.

5.3 SÍNTESE SOLÚVEL DE PEPTÍDEOS

Tendo como base os resultados do mapeamento de epítomos imunodominantes, dos ensaios imunoquímicos e da análise por bioinformática foram selecionados, no presente estudo, 31 possíveis peptídeos a serem sintetizados e avaliados. Foram escolhidos para síntese 9 desses, 4 (F1 a F4) resultantes da primeira seleção de peptídeos e 5 (F5 a F9) da segunda seleção de peptídeos. Foi escolhido, sintetizar esses peptídeos por terem, a partir do cálculo da relação entre o valor de densitometria positiva sobre o valor de densitometria negativa, valores acima de 2 (**Tabela 8**). Decidiu-se, também, sintetizar um peptídeo (F1) em que essa relação foi 1,93 devido à proximidade com o parâmetro estabelecido.

Tabela 8 – Peptídeos escolhidos para síntese na forma solúvel.

Peptídeo sintetizado	Posição na membrana	Posição no <i>Image J</i>	Sequencia de aminoácidos	<i>Pool</i> Negativos	<i>Pool</i> Positivos	POS/CN
F1	C09	L3/C9	A-S-P-I-A-S-R-L-R-E-R-R-E-N-P	6325,25	16613	2,62645
F2	A10	L1/C10	Q-R-V-L-L-E-A-R-K-Q-V-P-G-E-D	4097,25	10756	2,62517
F3	B10	L2/C10	E-A-R-K-Q-V-P-G-E-D-G-R-P-T-Q	5388,25	11345	2,1055
F4	B09	L2/C9	P-R-T-P-T- A-S-P-I-A-S-R-L-R-E	6248,25	12071	1,9319
	Q03	L17/C3	P-K-R-I-G-T-G-D-R-L-I-N-L-V-Q	6754,25	12737	1,88577
	B02	L2/C2	Y-G-C-K-T-T-D-R-K-K-Q-Q-T-Y	9682,25	17010	1,75682
	M10	L13/C10	A-A-R-R-P-T-N-L-A-Q-V-K-Q-V-V	6182,25	10376	1,67827
	S07	L19/C7	F-S-L-D-S-I-S-Q-V-E-K-K-I-F-A	9084,25	14413	1,58659
	D03	L4/C3	Y-D-P-I-A-L-F-T-V-S-R-Q-V-S-T	6487,25	10102	1,5572
	T08	L20/C8	P-G-G-H-G-P-P-S-G-P-R-T-P-T	9894,25	15331	1,54948
	S02	L19/C2	Q-F-T-Q-K-G-R-Q-A-S-W-D-G-P-K	6489,25	10003	1,54147
	A03	L1/C3	W-D-G-P-K-M-W-G-L-R-L-Y-R-T-G	7825,25	10990	1,40442
	P10	L16/C10	Q-G-K-E-E-T-P-A-A-F-L-E-R-L-K	9592,25	13383	1,39518
	H05	L8/C5	H-F-A-K-A-V-R-F-R-R-E-P-I-S-L	8735,25	11555	1,3228
	Q02	L17/C2	C-E-G-K-C-N-P-L-V-L-Q-F-T-Q-K	8286,25	10388	1,25364
	S09	L19/C9	L-Q-A-L-L-T-G-E-E-R-Q-R-V-L-L	9914,25	10466	1,05565

A

Peptídeo sintetizado	Posição na membrana	Posição no <i>Image J</i>	Sequencia de aminoácidos	<i>Pool</i> Negativos	<i>Pool</i> Positivos	POS/CN
F5	G11	L7/C11	G-L-Q-G-F-T-L-S-D-L-L-K-E-A-E	7932,75	62399,25	7,86603
F6	D10	L4/C10	G-R-P-T-Q-L-P-N-V-I-D-E-T-F-P	5016,75	21152,25	4,21633
F7	Q10	L17/C10	T-P-A-A-F-L-E-R-L-K-E-A-Y-R-M	5354,75	19946,25	3,72496
F8	E10	L5/C10	L-P-N-V-I-D-E-T-F-P-L-T-R-P-N	13189,75	48369,25	3,66719
F9	F11	L6/C11	L-Q-R-L-E-G-L-Q-G-F-T-L-S-D-L	5592,75	17162,25	3,06866
	E11	L5/C11	D-I-R-N-K-L-Q-R-L-E-G-L-Q-G-F	9046,75	20995,25	2,32075
	N06	L14/C6	F-D-S-Q-Q-G-W-F-E-G-W-F-N-K-S	10209,75	19467,25	1,90673
	P10	L16/C10	Q-G-K-E-E-T-P-A-A-F-L-E-R-L-K	11797,75	20260,25	1,7173
	C06	L3/C6	E-V-V-L-Q-N-R-R-G-L-D-I-L-F-L	15294,75	26089,25	1,70577
	Q02	L17/C2	C-E-G-K-C-N-P-L-V-L-Q-F-T-Q-K	12184,75	20338,25	1,66916
	S09	L19/C9	L-Q-A-L-L-T-G-E-E-R-Q-R-V-L-L	10876,75	18119,25	1,66587
	B07	L2/C7	C-I-L-N-R-L-V-Q-F-V-K-D-R-I-S	11543,75	18545,25	1,60652
	T08	L20/C8	P-G-G-H-G-P-P-S-G-P-R-T-P-T	14982,75	21188,25	1,41418
	S07	L19/C7	F-S-L-D-S-I-S-Q-V-E-K-K-I-F-A	14107,75	19168,25	1,3587
	K03	L11/C3	R-Q-S-Q-T-G-S-K-V-A-T-Q-R-P-Q	15163,75	18519,25	1,22128
	H05	L8/C5	H-F-A-K-A-V-R-F-R-R-E-P-I-S-L	15245,75	18291,25	1,19976

B

Peptídeos escolhidos para síntese na forma solúvel a partir da primeira seleção de peptídeos (**A**) e da segunda seleção de peptídeos (**B**) para serem sintetizados e avaliados na próxima etapa do projeto. Peptídeos sintetizados destacados pelo retângulo verde.

Os peptídeos sintetizados se encontram na região do gene *gag* FeLV que codifica as proteínas p12 (F1 e F4) e p30 (F2, F3, F5, F6, F7, F8, F9). Na figura 9 foram representadas a sequencia de aminoácidos correspondente as proteínas p12 e p30 do FeLV e a localização de cada peptídeo selecionado nos ensaios imunológicos realizados.

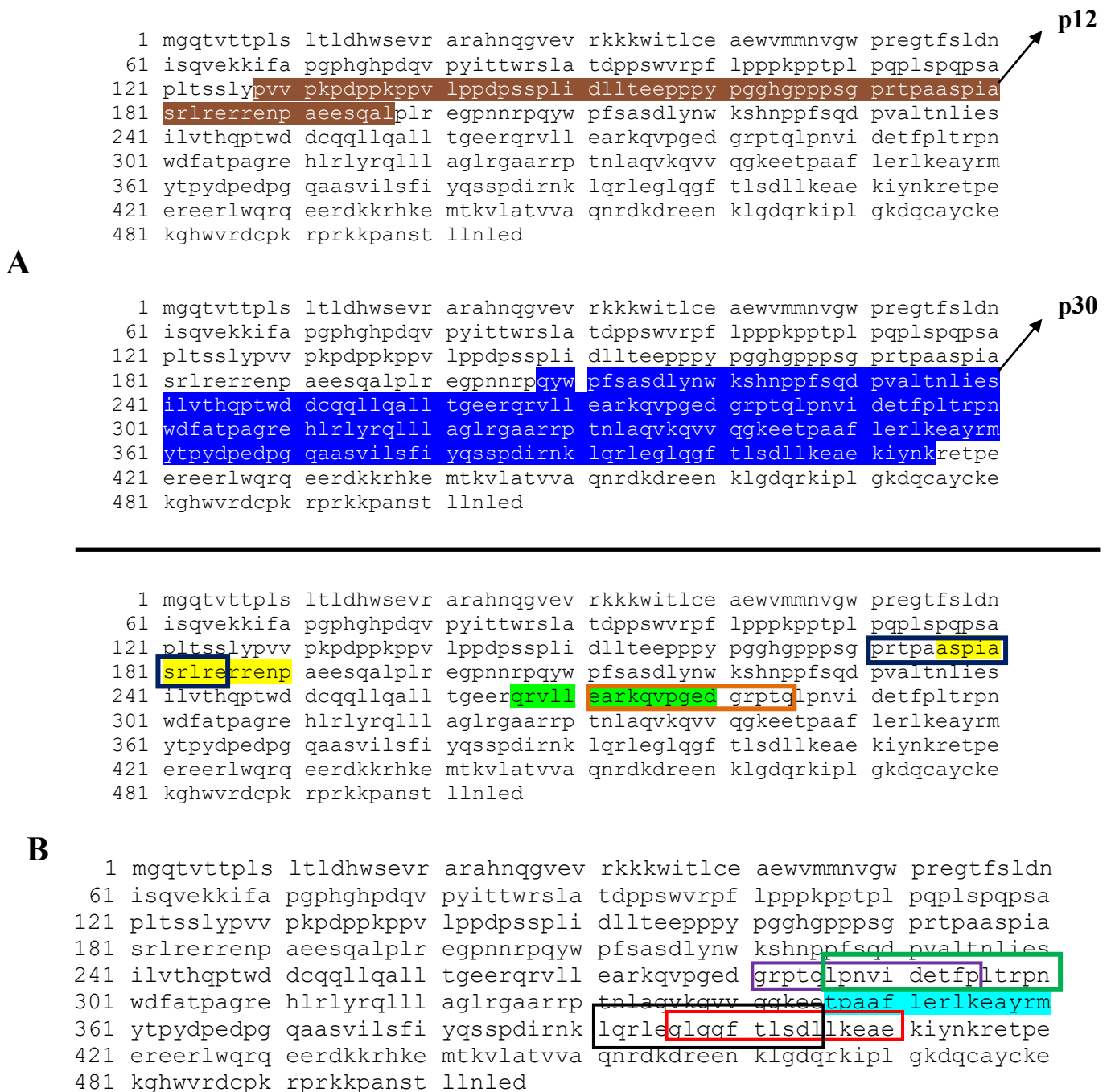


Figura 9 – Sequencia de aminoácidos correspondente ao gene *gag* (capsídeo) do FeLV (acesso *Genbank*: AAA 43055.1). **A** – Destacado de marrom a região do gene *gag* que codifica a proteína p12 e destacado de azul a região do gene *gag* que codifica a proteína p30. **B** – Destacado de amarelo o peptídeo sintético F1, em verde o peptídeo sintético F2, retângulo laranja peptídeo sintético F3, retângulo azul escuro peptídeo sintético F4, retângulo vermelho peptídeo sintético F5, retângulo roxo peptídeo sintético F6, destacado de azul piscina peptídeo sintético F7, retângulo verde peptídeo sintético F8 e retângulo preto peptídeo sintético F9.

5.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO pp30

O ELISA indireto pp30 utilizando peptídeos sintéticos, como antígenos adsorvidos em placas, foi padronizado a partir das seguintes condições: 1µg de peptídeo por poço, soro na diluição 1:50 e conjugado espécie específico na diluição 1:10.000. A placa de ELISA que proporcionou um melhor resultado foi a High Binding (*Costar® ELA/RIA Plate, 96well, No Lid Flat Botton, High Binding, Non-Sterile, Polystyrene*). Dos 9 peptídeos sintetizados, o F5 e F6 apresentaram melhores resultados nas leituras de densidade óptica (melhor diferenciação entre amostras positivas e negativas), tendo como referência os testes ensaio imunocromatográfico e PCR pré-realizados na mesma amostra avaliada neste ELISA. A temperatura de incubação nas diferentes etapas do ensaio a que proporcionou melhores resultados foi 37°C.

5.5 TESTE EM ELISA pp30

Foram testadas amostras de gatos, que compõe o banco de amostras do Laboratório de Retrovírus da EV/UFGM, cedidas por clínicas veterinárias (Vetcheck up pet e Animattus), abrigo (Albita), estabelecimentos governamentais (Centro de controle de zoonoses e Hospital Veterinário da UFGM) e profissionais autônomos (Dra. Marina Mourão e Dra. Bianca Moreira de Souza). Entre os testes utilizando os peptídeos F5 e F6, houve variações no número de amostras testadas utilizando os dois, devido ao volume insuficiente de algumas delas. O perfil de resposta de anticorpos avaliado a partir do ELISA indireto pp30 foi heterogêneo para animais infectados nos cursos de infecção progressivo (20 amostras), regressivo (1 amostra) e abortivo (115 amostras). Não se observou, também, diferença entre o grupo de gatos teste imunocromatográfico (TI) e PCR positivos e o grupo de gatos TI e PCR negativos, nas amostras clínicas testadas no ELISA pp30, para ambos os antígenos F5 (**Gráfico 1**) e F6 (**Gráfico 2**).

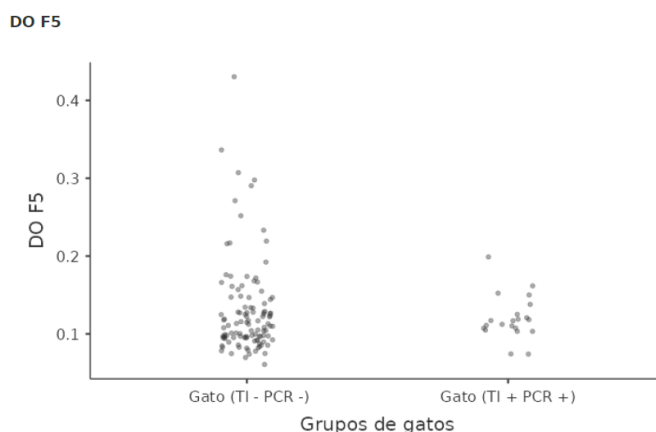


Gráfico 1 – Distribuição dos resultados (DO) das 132 amostras no ELISA pp30 com peptídeo F5 em grupos de gatos TI – PCR – (n=111) e TI+ PCR+ (n=21).

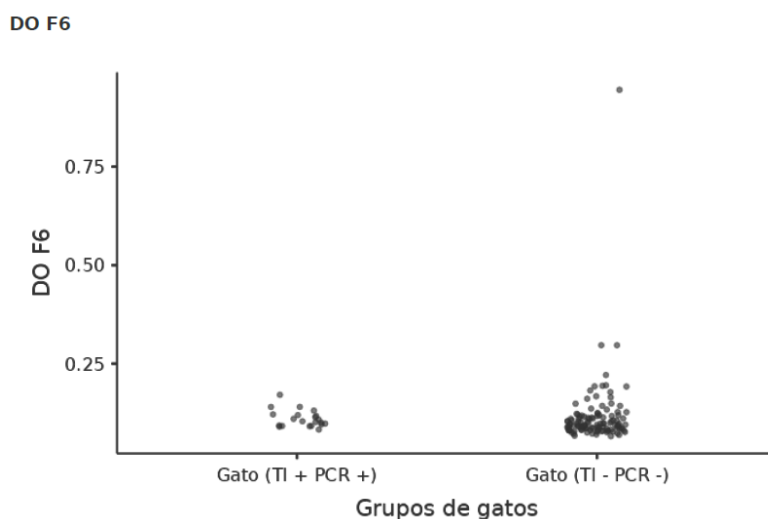


Gráfico 2 – Distribuição dos resultados (DO) das 137 amostras no ELISA pp30 com peptídeo F6 em grupos de gatos TI+ PCR+ (n=21) TI – PCR – (n=116).

No presente estudo, há valores de densidade óptica (DO) no ELISA pp30, que devem ser melhor avaliados devido ao seu alto valor em relação aos demais (*Outlier's*). Foi definido como outliers valores que estão fora do limite do intervalo de DO estabelecido pela fórmula para definir *outlier's* (**Quadro 5**) apresentada no livro “Exploratory Data Analysis” do autor John Tukey (1977).

Quadro 5 – Fórmula para cálculo de *outlier's* (John Tukey, 1977).

1. Calcular a média e o desvio padrão dos valores de DO de todas as amostras de cada peptídeo (F5 e F6);
2. Definir os limites usando como critério 2 desvios padrão:

Limite inferior	média – 2 x desvio padrão
Limite superior	média + 2 x desvio padrão;
3. O valor de DO é considerado *outlier* se estiver fora desse intervalo.

Foram identificados 7 *outlier's* que apresentaram DO acima de 0,240 utilizando o antígeno F5. Da mesma forma, 3 *outlier's* que apresentaram DO acima de 0,276 que se destacaram no ELISA pp30 com antígeno F6. Todos os *outlier's* nesse estudo pertencem ao grupo de gatos TI – PCR –.

Dentre os *outlier's*, algumas amostras devem ser melhor avaliadas devido ao seu alto valor de DO em relação aos demais. No gráfico 1, com uso do peptídeo F5, por exemplo, destacaram-se os *outlier's* com DO acima de 0,290 (amostras 3, 34, 40, 56, 72), conforme

demonstrado na tabela 9. Nessas amostras não foram observadas diferença entre sexos no valor de DO. Todos os animais são oriundos de Belo Horizonte e região metropolitana, somente um deles foi vacinado (131) e as idades variaram entre 6 meses e 11 anos. No ELISA indireto pp30 com peptídeo F6, todas as amostras apresentaram DO no mesmo patamar, acima de 0,295 (amostras 47, 57, 114), e reafirmando a característica dos *outlier's*, já apresentado (F5), sem diferenciação entre sexo, mesma localização, sem dados sobre o status de vacinal e idade.

Tabela 9 – *Outlier's* do ELISA pp30. *Outliers* F5 (A). *Outliers* F6 (B). Valores discrepantes de DO.

<i>Outlier's</i> F5		
Amostras	$\geq 0.200-0.299$	≥ 0.300
3	x	0.307
5	0.271	x
34	0.298	x
40	x	0.336
56	x	0.430
72	0.290	x
131	0.252	x

A

<i>Outlier's</i> F6		
Amostras	$\geq 0.200-0.299$	≥ 0.300
47	0.297	x
57	x	0.945
114	0.297	x

B

Estes dados apresentados referentes aos *outlier's* do gráfico 1 é um retrato dos demais *outlier's* identificados nesse estudo (5, 131 – F5) (**Figura 9**). Vale reafirmar que todos esses *outlier's* pertencem ao grupo de gatos TI e PCR negativos para FeLV. A idade dos animais identificados como *outlier's*, ao realizar ELISA indireto com peptídeo F5, varia entre 6 meses e 11 anos. Já em relação ao ELISA indireto realizado com peptídeo F6 a idade dos gatos *outlier's* variou de 1 ano a 6 anos. Deve-se evidenciar que não houve diferença em relação ao

sexo dos gatos não só entre os *outlier's*, mas em todo o “N” amostral desse estudo. Infelizmente, não se tem dados epidemiológicos completos de todos os indivíduos, o que ajudaria a avaliar possíveis variáveis que tem influência nos dados e por consequência no resultado final desse estudo, e o porque do comportamento apresentado pelos valores do ELISA, resultado deste experimento.

Entre os animais vacinados, novamente foi observado um perfil de dispersão ao acaso a partir das DOs no ELISA pp30 (**Tabela 10**). Dos 16 animais vacinados, todos são classificados como pertencentes ao grupo de gatos TI e PCR negativos. Há valores de DO que se destacam (valor de DO discrepante) dentre os gatos imunizados (131 e 126), os *outlier's*, variando, inclusive, de um peptídeo para outro em uma mesma amostra avaliada.

Tabela 10 – Resultado do ELISA indireto pp30 (valores de DO) dos peptídeos F5 e F6 de animais vacinados. Em destaque os *outlier's*.

DO de animais vacinados				
Amostra	Grupos de gatos	Local	DO F5	DO F6
27	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.110	0.066
125	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.113	0.089
126	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.095	0.297
127	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.099	0.097
128	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.117	0.088
129	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.122	0.113
130	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.162	0.075
131	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.252	0.149
132	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.157	0.119
133	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.172	0.080
134	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.075	0.078
135	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.085	0.075
136	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.148	0.105
137	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.133	0.117
138	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.192	0.182
139	Gatos TI e PCR negativos	Belo Horizonte	0.085	0.106

6 DISCUSSÃO

A FeLV, doença infecciosa de grande relevância em todo o mundo, apresenta uma complexa patogênese e, somado a isso, os seus quatro cursos de infecção que podem variar mediante o desenvolvimento da doença, tornam o seu diagnóstico desafiador. Identificar e segregar gatos infectados são a melhor forma de controle, e a falha nessa prevenção pode proporcionar uma exposição descontrolada e, por consequência, a transmissão do vírus a animais susceptíveis (R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021).

Na rotina clínico-laboratorial, os testes diagnósticos empregados para a detecção do FeLV pela proteína p27 não permitem a identificação de gatos em todos os cursos de infecção possíveis, detectando apenas animais no curso progressivo (Lutz, *et al.*, 2009; Willet e Hosie, 2013). Mesmo empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR), de forma associada (Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2010; Boenzli, *et al.*, 2014), ainda se vê a necessidade de se desenvolver um novo método diagnóstico. Para isso, neste estudo foi desenvolvido um imunoensaio enzimático, ELISA indireto, utilizando peptídeos sintéticos obtidos por mapeamento antigênico na metodologia de *spot synthesis*, para ser utilizada como ferramenta complementar na estratégia de diagnóstico de infecção pelo FeLV a partir da resposta imune dos gatos.

A confecção da membrana para o mapeamento de epítomos imunodominantes, a partir da técnica de *Spot Synthesis*, foi realizada no Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), tendo como base o trabalho de Frank (1992); este laboratório possui a tecnologia e maquinário para a execução do processo e, assim, forneceu a membrana pronta, a partir de dados das sequências de aminoácidos das principais proteínas do FeLV, possibilitando a continuidade do experimento, no Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária da UFMG, onde aconteceu o restante de todo esse estudo.

O método *Spot Synthesis* permite, para triagem biológica, o acesso, simples e econômico, a milhares de sequências curtas de peptídeos, as quais, em ensaios de ligação de anticorpos produzem resultados idênticos a outras metodologias (Frank, 1992). Uma vantagem do emprego da síntese de peptídeos em fase sólida, segundo Vordermeier e colaboradores (2001) é que essa técnica permite um controle de qualidade preciso em relação à cobertura completa das regiões do gene utilizado como base de produção da membrana, com peptídeos do vírus em estudo. A capacidade de síntese em uma membrana como a usada neste estudo é evidenciada no trabalho de Faria e colaboradores (2011) quando relatam que 360 peptídeos foram sintetizados em membrana utilizada como base para posterior desenvolvimento de imunodiagnóstico para a Leishmaniose visceral canina. Laune (2002) a partir da sequência de aminoácidos dos domínios VH e VL de um anticorpo, cobrindo todas as regiões gênicas desse anticorpo, sintetizou uma membrana de celulose com esses peptídeos (12 aminoácidos sobrepostos), que permitiu a identificação de atividade residual de um anticorpo original anti-CD4. Desse modo é possível identificar a versatilidade e a importância do emprego da *Spot Synthesis*, principalmente, como base para o desenvolvimento de imunodiagnósticos.

Em continuidade ao mapeamento, a seleção de epítomos lineares foi executada, neste estudo, a partir de um ensaio imunoquímico, o immunoblotting. A membrana foi sensibilizada com *pool* de soros positivos e negativos, em dias diferentes, para testar a reatividade desta, a partir da interação antígeno-anticorpo, possibilitando a sinalização dos epítomos mais imunodominantes. A revelação e a fotodocumentação foram realizadas no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos do ICB- UFMG. O immunoblotting, a revelação e a fotodocumentação foram realizados tendo como base protocolos já padronizados pelo Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos do ICB-UFMG (Siqueira, *et al.*, 2023; Ruas, *et al.*, 2025). No presente estudo, ao revelar a membrana imunosensibilizada com *pool* de soros negativos e positivos, foi possível observar, a partir da reatividade dos *spots* da membrana, uma perfeita distinção entre soros positivos e negativos.

Após a fotodocumentação, utilizando recursos de bioinformática, no presente estudo, foi possível a seleção de peptídeos correspondentes às regiões dos genes *env* e *gag* do FeLV. Para tanto, também foram utilizados como base protocolos desenvolvidos no laboratório de Genômica e Malária do ICB-UFMG (Siqueira, *et al.*, 2023; Ruas, *et al.*, 2025). O ensaio imunoquímico, assim como, a seleção de peptídeos foi realizada duas vezes objetivando a confirmação da primeira seleção realizada e a seleção de possíveis novos peptídeos. Ao todo foram selecionados 31 peptídeos, no entanto, foi escolhido sintetizar apenas os peptídeos cuja proporção entre valor de densitometria positiva e negativa, obtidas, fosse maior que 2 (F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 e F9). Na tentativa de não perder peptídeos promissores para o objetivo final do estudo, foi sintetizado, também, o peptídeo com o valor da relação acima descrita de 1,93 (F1). Esta relação escolhida como parâmetro, no presente estudo, é uma tentativa de

proporcionar uma melhor e mais forte interação, por aderência, entre o peptídeo e o material da placa de ELISA (poliestireno) utilizada. Esta prática pode levar a uma melhor execução do teste em padronização e, possivelmente, ao resultado desejado para esse método diagnóstico em desenvolvimento. Coincidentemente, neste estudo, todos esses nove peptídeos (F1 a F9) escolhidos pertencem à região do gene *gag*. As proteínas codificadas pelo gene *gag*, por terem função estrutural, exercem um papel fundamental na montagem dos vírions, que ocorre na membrana plasmática, e também, atua induzindo a formação e liberação de partículas semelhantes ao vírus, que auxiliam a não identificação do FeLV pelo sistema imune do hospedeiro (Kawamura, *et al.*, 2015). O emprego de peptídeos sintéticos, segundo Quiroz-Castaneda e colaboradores (2019), caracteriza um grande avanço biotecnológico decorrente do acesso à genomas completos de patógenos e do avanço propiciado pelas análises computacionais viabilizadas para a ciência dos peptídeos. Essa evolução científica torna possível o desenvolvimento de vários métodos diagnósticos. Vordermeier e colegas (2001) complementam esse dado relatando as vantagens do uso de peptídeos sintéticos como, a menor demanda de gastos para esses serem produzidos, a facilidade para padronizar seu uso e por permitirem um controle de qualidade do diagnóstico desenvolvido a partir deles; além disso, afirmam ser nulo o risco de contaminação cruzada do peptídeo com antígenos do hospedeiro (Gonzalez, *et al.*, 1997), já que ele é totalmente sintetizado de forma química. Por fim, Ferrer *et al.* (2003) acrescentam que o uso de peptídeos sintéticos otimiza a especificidade dos imunoenaios ao se comparar com o uso de antígenos brutos. Dos 180 peptídeos derivados da sequência de aminoácidos da proteína do protozoário *L. infantum* submetidos à *Spot Synthesis* e imunoensaio, 25 peptídeos se mostraram promissores para o desenvolvimento de um sorodiagnóstico para a Leishmaniose Visceral Canina (Faria, *et al.*, 2011). A síntese química solúvel dos peptídeos selecionados, neste estudo, também foi realizada pela equipe do Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos (ICB-UFMG).

O uso de peptídeos sintéticos como antígenos para ensaios imunológicos proporciona certas vantagens em comparação com métodos tradicionais de produção de antígenos nativos, com o uso de carreadores e com emprego de métodos por produção recombinante em sistemas heterólogos. O uso de cultivos de vírus para a produção de antígenos nativos não seria mais a melhor opção, por ser um processo trabalhoso e que apresenta risco de contaminação com proteínas da célula ou do meio de cultura, além de agravantes relacionados à biossegurança para alguns vírus patogênicos (Sugiura, *et al.*, 1995). Em relação ao uso de proteínas recombinantes a partir de sistemas heterólogos, pode-se ter dificuldades em obter proteínas funcionais, biologicamente ativas e solúveis, para algumas estirpes de vírus. Em determinados microrganismos, sobretudo em *Escherichia coli*, nota-se uma dificuldade em produzir proteínas complexas, constituídas por pontes de enxofre, múltiplas subunidades ou modificações pós-traducionais; isso ocorre pelo fato de que procariotos não tem maquinário necessário para realizar estes tipos de modificações (Baneyx, 1999; Costa, *et al.*, 2014).

A padronização de um ELISA indireto para FeLV com uso de peptídeos sintéticos como antígenos, objetivo principal desse estudo, foi desafiadora. Promover a adsorção do peptídeo sintético nas placas de ELISA compostas de poliestireno foi a primeira dificuldade encontrada. Tendo como base metodologias anteriores, bem sucedidas, para padronizar o ELISA, no presente estudo, inicialmente foi utilizado placas de ELISA convencionais Maxisorb Nunc (Thermo Scientific™) (De Faria Naves, 2015; Alves, *et al.*, 2013; Fargeas, *et al.*, 1996 e Wang, *et al.*, 1986). Foi observado, neste teste, que os peptídeos aparentemente não se adsorveram as placas, por apresentarem valores de DO muito baixos e que não diferenciava entre amostras positivas negativas para TI e PCR. Como estratégia, foram utilizadas, placas

Medium Binding (Costar® EIA/RIA Plate, 96well, No Lid Flat Botton, Medium Binding, Non-Sterile, Polystyrene) e *High Binding* (Costar® EIA/RIA Plate, 96well, No Lid Flat Botton, High Binding, Non-Sterile, Polystyrene). que foi quando obteve-se o melhor resultado. Segundo Geerlin e colaboradores (1988) e Ball e colaboradores (1994) essa dificuldade é um reflexo do tamanho do peptídeo e das cargas eletrostáticas dos aminoácidos que o compõem.

As temperaturas de incubação foram, também, fonte de avaliação mediante os resultados preliminares. Inicialmente, para adsorção dos peptídeos sintéticos as placas foram incubadas a 4° C, *overnight*, tendo como base o trabalho de Naves (2015), que também utilizou peptídeo sintético como antígeno no ELISA indireto padronizado para anemia infecciosa equina. Como estratégia para resolver esta questão o Laboratório de Genômica e Malária de Parasitos (ICB-UFGM), que com frequência trabalha e padroniza ELISA's utilizando peptídeos sintéticos, foi consultado. Como alternativa, foi empregada a temperatura de 37°C em todas as etapas, com exceção da do substrato, onde obteve-se uma melhora na leitura de absorbâncias. ELISA's que utilizam peptídeo sintético como antígeno, normalmente, incubam o peptídeo adsorvido a 4° C *overnight* e as demais incubações são realizadas a temperatura ambiente ou a 37°C, em estufa (Resende, *et al.*, 2020; Quiroz-Castaneda, *et al.*, 2019; Naves, *et al.*, 2019 e Alves, *et al.*, 2013).

Dentre os nove peptídeos escolhidos, os que mostraram melhores resultados na padronização do ELISA indireto foram o F5 e F6. Estes peptídeos estão localizados na proteína p30 do FeLV, codificada pelo gene *gag*. A p30 é uma proteína do core viral que exerce um papel fundamental na montagem do vírion, que ocorre na membrana plasmática, e também, atua induzindo a formação e liberação de partículas semelhantes ao vírus, que auxiliam a não identificação do FeLV pelo sistema imune do hospedeiro (Kawamura, *et al.*, 2015). Em estudos anteriores semelhantes, a maioria dos peptídeos selecionados e sintetizados foram capazes de detectar, a partir de um ELISA indireto, uma grande porcentagem de cães positivos para Leishmaniose visceral canina, os quais não foram identificados em Kits rápidos para o mesmo protozoário (Faria, *et al.*, 2011).

A p30, além de compor a estrutura básica do núcleo viral, é uma proteína viral estável derivada de polipeptídeos precursores (Pinter e Fleissner 1978). Em seu estudo, Okasinskie e Velicer (1976) concluíram a partir de uma análise que envolve peptídeos trípticos de polipeptídeos precursores intracelulares e proteínas estruturais dos vírions, que os principais polipeptídeos estruturais não glicosilados do FeLV são sintetizados mediante um precursor de 70.000 daltons. O autor complementa relatando que este importante precursor, um polipeptídeo de 70.000 daltons (Pp70), compõe e se encontra intracelularmente no FeLV, e que estes contêm os peptídeos trípticos do FeLV p30, p15, p11 e p10. Por outro lado, Okasinskie Velicer (1977) descreve a inexistência de peptídeos intracelulares precipitáveis por anti-p30, além do Pp60 e o próprio p30, o levou a concluir que p30 é gerado pela clivagem direta de Pp60; e justificou essa premissa afirmando que a sequência de proteínas estruturais de FeLV da suporte a essa interpretação, pelo fato de que a p30 está na extremidade carboxila da fração Pp60. Khan e Stephenson (1977), ao isolar as proteínas estruturais do FeLV, o antígeno interno principal de 27.000 a 30.000 daltons foi designado como p30. Já no trabalho de O'brien e Simonson (1978) observa-se a abordagem dessa proteína estrutural p30 como p27-30, o que demonstra uma variação entre pesquisadores ao designar essa proteína estrutural e, até mesmo, demonstra uma imprecisão sobre a melhor abordagem, já que é a mínima variação de massa molecular (3000 daltons) que é o que as diferenciam. Aparentemente essa diferença não influencia a atuação dessa proteína estrutural

na montagem e liberação do vírus para o meio extracelular. O'Brien e Simonson (1978) complementam relatando que antígenos derivados da proteína estrutural principal interna, p27-30 é encontrada em grandes quantidades nas células infectadas pelo FeLV.

Para avaliar o resultado do ELISA padronizado e testado, nesse estudo, os valores de DO foram normalizados com objetivo de eliminar a variação entre placas em experimentos realizados em dias diferentes (variação interensaio). O ELISA indireto pp30 não apresentou distinção nos valores de DO entre os grupos de gatos com TI e PCR positivos e gatos com TI e PCR negativos para FeLV analisados, consequentemente não foi possível diferenciar amostras positivas de negativas, e possivelmente não se conseguiria diferenciar animais infectados de não infectados. Notou-se, no entanto, tendo como referencia os gráficos 1 e 2, um valor de DO mais elevado para algumas das amostras utilizadas, denominados *outlier's*, tanto em relação ao ELISA indireto pp30 utilizando o peptídeo F5 quanto utilizando F6. Todos os *outlier's* (13 amostras) encontrados eram classificados como pertencentes ao grupo de gatos TI e PCR negativos para FeLV e apenas 2 dos 13 *outlier's* eram vacinados com vacinas compostas por vírus inativados. Em trabalho anterior, gatos com títulos de anticorpos anti-p30 do FeLV maiores ou iguais a 200, detectados pelo teste de radioimunoprecipitação, eram animais saudáveis que viviam em domicílio com grande número de animais com leucemia e não eram virêmicos (Charman, *et al.*, 1976). Vacinas inativadas, segundo Flores (2003), induzem resposta sorológica moderada, em rebanhos vacinados contra o vírus da diarreia viral bovina, ou seja, não levam a aumentos tão significativos de anticorpos no animal vacinado, o que corrobora com o quadro apresentado neste estudo onde os *outlier's* vacinados eram apenas 2 gatos.

No ELISA pp30 peptídeo F5, há oito amostras (3, 34, 40, 47, 56, 57, 72, 114) se destacaram em relação aos demais *outlier's* pelos elevados valores de DO, que variou de 0,290 a 0,430 e ao perfil apresentado no gráfico devido seu afastamento em relação aos demais valores de DO. Estes dados podem ser interpretados como gatos com resposta imune aumentada ao FeLV visto que esses animais vivem em um ambiente onde existe a circulação do vírus e, principalmente, por residirem em Belo Horizonte e região metropolitana onde a doença tem prevalência variando entre 32,5% e 47,5% (Teixeira et al., 2007; Coelho et al., 2011). Desse grupo de 8 amostras, em nosso estudo não foi possível inferir alguma influência, sobre os valores de DO apresentados, em relação a idade dos animais que variou de 6 meses a 11 anos. Essa faixa etária engloba animais anteriormente classificados como menor suscetibilidade de serem infectados (2-11 anos) e gatos com maior suscetibilidade (abaixo de 2 anos) (Guimarães, 2014; R. Hofmann-Lehmann e K. Hartmann, 2021). Levando em consideração o sexo do gato testado no ELISA pp30, por não haver diferença no valor de DO, a resposta imune ao FeLV é observada tanto em machos quanto em fêmeas, sem distinção. As 21 amostras classificadas como de gatos pertencentes ao grupo TI e PCR positivos, no ELISA pp30, em sua maioria, apresentaram baixa leitura de DO, o que é diretamente relacionado a quantidade de anticorpos específicos anti-p30 nas amostras. A variedade de resultados de infecção é um reflexo de como o sistema imune de cada gato estabelece respostas diferentes ao FeLV (Lutz, *et al.*, 1980). Para Charman e colaboradores (1976), gatos infectados, virêmicos, normalmente não apresentam anticorpos livres contra a p30, e ainda acrescenta que esse dado pode ser consequência dos efeitos imunossupressores da infecção pelo vírus (Mazzotti e Guimarães, 2014) ou decorrente de um excesso de antígenos. Gatos infectados que são persistentemente virêmicos, curso de infecção progressiva, apresentam baixos valores de DO em sua maioria, ou seja, níveis de anticorpos mais baixos (Lutz, *et al.*, 1980). Por fim,

Charman *et al.*, (1976) acrescenta que em grande parte dos animais com doenças induzidas ou associadas ao FeLV não foi identificado anticorpos livres contra a proteína p30 do FeLV.

Dentre as limitações deste estudo podemos destacar o volume insuficiente de algumas amostras que impediu repetições dos testes em alguns casos. Além disso, houve dificuldade na coleta de sangue de alguns gatos, bem discutida no trabalho de Mattoso e colaboradores (2020), devido ao *stress* que o animal sofre durante o procedimento, fazendo com que esse produza uma constrição venosa voluntária, tendo como consequência a diminuição no volume sanguíneo possível de ser coletado. Um fator que dificultou a análise epidemiológica das amostras avaliadas foi a falta de dados dos animais, o que impossibilitou uma análise mais precisa e aprofundada dos resultados do ELISA pp30.

O emprego do peptídeo sintético pp30 como antígeno em um ELISA indireto pode ser uma alternativa interessante na triagem de gatos com FeLV. A detecção de anticorpos anti-p30, pelo ELISA pp30, mostrou resultados promissores, porém ainda são necessários mais estudos para aprimorar o diagnóstico sorológico em desenvolvimento, principalmente, a distinção entre animais infectados dos não infectados. Estudos realizados sobre o FeLV apontam uma evolução, nos últimos anos, a respeito do controle e diagnóstico da FeLV, apesar de ainda se incentivar um aprimoramento nesses aspectos, principalmente, devido a ações negligentes de tutores. A complexidade da doença e suas manifestações clínicas associadas às possibilidades do vírus de se instalar e multiplicar em vários tecidos e órgãos, além das diferentes respostas imunes do hospedeiro, tornam o diagnóstico laboratorial desafiador. Nesse cenário, novas metodologias, como a proposta neste estudo, visam complementar as já existentes. Compete a nós pesquisadores, e principalmente, Médicos Veterinários, insistir na evolução desse quadro, na melhora do diagnóstico e, assim, permitir um tratamento e um prognóstico mais favorável para os gatos.

7 CONCLUSÃO

A técnica *Spot Synthesis* e o uso da bioinformática possibilitaram o mapeamento e seleção de peptídeos correspondentes a regiões de *gag* e *env* do genoma do FeLV, posteriormente sintetizados em sua forma solúvel, e que foram utilizados como antígenos para a padronização de um ELISA indireto.

Mediante os resultados do ELISA pp30 padronizado, ainda não foi possível distinguir precisamente gatos infectados de não infectados e, principalmente gatos em outros cursos de infecção do FeLV que não em sua forma mais grave, progressiva. Tornou-se, também, relevante a avaliação mais criteriosa de gatos que apresentam perfil de respostas de anticorpos aumentadas em relação ao FeLV (p30), denominados *outlier's*, e pertencentes ao grupo de animais não infectados. É válido e se deve incentivar a continuidade da pesquisa, do desenvolvimento desse e de outros imunodiagnósticos e, também, de novas formas de controle para uma doença infecciosa tão grave para os gatos de todo o mundo.

8 PERSPECTIVAS

- Aumentar o “n” amostral de animais a serem testados nos ELISAS indiretos que pesquisam anticorpos anti-p30 do FeLV.;
- Avaliar de forma longitudinal animais que apresentam valores altos de DO, caracterizados por títulos maiores de anticorpos anti-FeLV-p30.
- Avaliar a possibilidade de trabalho com peptídeos provenientes de outras regiões dos genes *env* e *gag* do FeLV, e por consequência outras proteínas;
- Otimizar a adsorção dos peptídeos sintéticos à placa de ELISA de poliestireno;
- Melhorar a sensibilidade e especificidade do ELISA no sentido de distinguir os valores de DO entre animais infectados e não infectados por FeLV;
- Detectar animais infectados em outros cursos de infecção, que não o progressor.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular E Molecular**. 9. ed. [s.l.] Elsevier Editora Ltda, 2018

ABKOWITZ, J. L. Retrovirus-induced feline pure red blood cell aplasia: pathogenesis and response to suramin. **Blood**, v. 77, n. 7, p. 1442–1451, 1991.

AHMAD, S.; LEVY, L. S. The frequency of occurrence and nature of recombinant feline leukemia viruses in the induction of multicentric lymphoma by infection of the domestic cat with FeLV-945. **Virology**, v. 403, n. 2, p. 103–110, 2010.

ALVARENGA, L. M. et al. Induction of neutralizing antibodies against Tityus serrulatus scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 1, p. 89–95, 2002.

ARJONA, A. et al. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3448–3449, 2000.

BABYAK, S. D. et al. Evaluation of a saliva test kit for feline leukemia virus antigen. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 5, p. 397–400, 1996.

BALL, J. M. et al. Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious anemia virus by using synthetic peptide strategies. **Journal of virology**, v. 66, n. 2, p. 732–742, 1992.

BANDE, F. et al. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia virus from naturally infected cats in malaysia. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p. 760961, 2014.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.

BARR, M. C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 11, n. 3, p. 144–153, 1996.

BENVENISTE, R. E.; SHERR, C. J.; TODARO, G. J. Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 190, n. 4217, p. 886–888, 1975.

BIEZUS, G. et al. Progressive and regressive infection with feline leukemia virus (FeLV) in cats in southern Brazil: Prevalence, risk factors associated, clinical and hematologic alterations. **Preventive veterinary medicine**, v. 216, n. 105945, p. 105945, 2023.

BOENZLI, E. et al. Detection of antibodies to the feline leukemia Virus (FeLV) transmembrane protein p15E: an alternative approach for serological FeLV detection based on antibodies to p15E. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2046–2052, 2014.

BOENZLI, E.; HADORN, M.; HARTNACK, S. Detection of Antibodies to the Feline Leukemia Virus (FeLV) Transmembrane Protein p15E: an alternative approach for serological FeLV detection based on Antibodies to p15E. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 5, p. 2046–2052, 2014.

BUPP, K.; SARANGI, A.; ROTH, M. J. Selection of feline leukemia virus envelope proteins from a library by functional association with a murine leukemia virus envelope. **Virology**, v. 351, n. 2, p. 340–348, 2006.

CATTORI, V. et al. Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 124–128, 2008.

CATTORI, V. et al. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. **Veterinary microbiology**, v. 133, n. 3, p. 292–296, 2009.

CATTORI, V.; HOFMANN-LEHMANN, R. Absolute quantitation of feline leukemia virus proviral DNA and viral RNA loads by TaqMan real-time PCR and RT-PCR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 429, p. 73–87, 2008.

CHARMAN, H. P. et al. Humoral immune responses of cats to feline leukemia virus: comparison of responses to the major structural protein p30 and to a virus-specific cell membrane antigen (FOCMA). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 4, p. 859–861, 1976.

COELHO, F. M. et al. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 778–783, 2011.

COFFIN, J. M. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. **The Journal of general virology**, v. 42, n. 1, p. 1–26, 1979.

COSTA, S. et al. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers in Microbiology**, n. 5, p. 1–20, 2014.

CROWTHER, J. R. **The ELISA guidebook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

DE MELLO, L. S. et al. Diseases associated with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection: A retrospective study of 1470 necropsied cats (2010–2020). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 95, n. 101963, p. 101963, 2023.

DE SOUZA, A. R. **Mapeamento de epítomos em parvovírus suíno por spot synthesis e análise in silico**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2016.

DE-SIMONE, S. G. et al. Epitope mapping of the diphtheria toxin and development of an ELISA-specific diagnostic assay. **Vaccines**, v. 9, n. 4, p. 313, 2021.

DE-SIMONE, S. G. et al. High-throughput IgG Epitope mapping of tetanus neurotoxin: Implications for immunotherapy and vaccine design. **Toxins**, v. 15, n. 4, 2023.

DUDA, N. C. B. et al. Laboratory and clinical findings and their association with viral and proviral loads in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 71, n. 101491, p. 101491, 2020.

DÜRAUER, A. et al. Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by SPOT synthesis. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 66, n. 1–3, p. 45–57, 2006.

ENGLERT, T. et al. Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 14, n. 6, p. 392–398, 2012.

FARGEAS, C. et al. Synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 2, p. 241–248, 1996.

FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1310, 2011.

FERRER, E. et al. Taenia saginata derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83–94, 2003.

FIRTH, C. L.; MÖSTL, K. A survey of feline leukaemia virus antigenaemia among cats in eastern Austria: a retrospective analysis of serum samples routinely tested between 1996 and 2011. **JFMS open reports**, v. 1, n. 2, p. 2055116915598336, 2015.

FLORES, E. F. **DIVULGAÇÃO TÉCNICA VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV) Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p.3-9, jan./dez. [s.l: s.n.].**

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora da Universidade Federal de Santa Maria Prédio da Reitoria - Campus Universitário Camobi - 97119-900 - Santa Maria - RS: Ed. da UFSM, 2007.

FLYNN, J. N. et al. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **Journal of virology**, v. 76, n. 5, p. 2306–2315, 2002.

FLYNN, J. N.; HANLON, L.; JARRETT, O. Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes: FeLV-specific CTL responses. **Immunology**, v. 101, n. 1, p. 120–125, 2000.

FRANCIS, D. P.; ESSEX, M.; HARDY, W. D., Jr. Excretion of feline leukaemia virus by naturally infected pet cats. **Nature**, v. 269, n. 5625, p. 252–254, 1977.

FRANK, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**, v. 48, n. 42, p. 9217–9232, 1992.

FRANK, R. et al. Combinatorial synthesis on membrane supports by the SPOT technique: Imaging peptide sequence and shape space. Em: **Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. p. 363–386.

GEERLINGS, H. J. et al. The influence of pH and ionic strength on the coating of peptide of herpes simplex virus type 1 in a enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 106, n. 2, p. 239–244, 1988.

GISELBRECHT, J. et al. Prevalence of different courses of feline leukaemia virus infection in four European countries. **Viruses**, v. 15, n. 8, p. 1718, 2023.

GISELBRECHT, J. et al. Evaluation of a revised point-of-care test for the detection of feline leukaemia p27 antigen and anti-p15E antibodies in cats. **Viruses**, v. 16, n. 4, 2024.

GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. 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**, v. 11, n. 12, p. 985–992, 2009.

GOLDKAMP, C. E. et al. Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 8, p. 1152–1158, 2008.

GOMES-KELLER, M. A. et al. 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**, v. 44, n. 3, p. 916–922, 2006a.

GOMES-KELLER, M. A. et al. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. **Veterinary microbiology**, v. 112, n. 1, p. 11–21, 2006b.

GREENE, C. E. **Doenças Infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 113-143, 2015.

GUIMARÃES, J. N.; GA., M. Métodos diagnósticos da Leucemia Viral Felina. **a. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 12, n. 14, p. 1–8, 2014.

HARDY, W. D. J. The feline leukemia virus. **J Am Anim Hosp Assoc** 17941-980, 1981.

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

HARDY, W. D., Jr; ZUCKERMAN, E. E. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1365–1373, 1991.

HAWKINS, E. C. et al. Use of tears for diagnosis of feline leukemia virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 9, p. 1031–1034, 1986.

HAWKINS, E. C. Saliva and tear tests for feline leukemia virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1382–1385, 1991.

HAYES, K. A.; ROJKO, J. L.; MATHES, L. E. Incidence of localized feline leukemia virus infection in cats. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 4, p. 604–607, 1992.

HELPER-HUNGERBUEHLER, A. K. et al. No benefit of therapeutic vaccination in clinically healthy cats persistently infected with feline leukemia virus. **Vaccine**, v. 33, n. 13, p. 1578–1585, 2015a.

HELPER-HUNGERBUEHLER, A. K. et al. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. **Virus research**, v. 197, p. 137–150, 2015b.

HILPERT, K.; WINKLER, D. F. H.; HANCOCK, R. E. W. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nature protocols**, v. 2, n. 6, p. 1333–1349, 2007.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Recombinant FeLV vaccine: long-term protection and effect on course and outcome of FIV infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 46, n. 1–2, p. 127–137, 1995.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 1, p. 33–42, 1997.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 7, p. 1589–1596, 2001.

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

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

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

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Feline leukemia virus infection: importance and current situation in Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 160, n. 2, p. 95–105, 2018.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HARTMANN, K. Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 9, p. 831–846, 2020.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HARTMANN, K. **FELINE LEUKAEMIA VIRUS INFECTION – ABCD recommendations and review of the literature**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.abcdcatsvets.org/wp-content/uploads/2023/01/ABCD-FeLV-Guideline-2021.pdf>>.

HOOVER, E. A. et al. Erythroid hypoplasia in cats inoculated with feline leukemia virus. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 5, p. 1271–1276, 1974.

HOOVER, E. A. et al. Feline leukemia virus infection: Age-related variation in response of cats to experimental Infection2. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 2, p. 365–369, 1976.

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

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **The veterinary record**, v. 125, n. 11, p. 293–297, 1989.

JARRETT, O. et al. Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1362–1364, 1991.

JARRETT, O.; GOLDER, M. C.; WEIJER, K. A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. **The veterinary record**, v. 110, n. 14, p. 325–328, 1982.

KHALIFE, S.; KASSAA, I. A. Occurrence and risk factors of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) in cats of Lebanon. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 93, n. 101931, p. 101931, 2023.

LACERDA, L. C. et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 2, 2017.

LAFRADO, L. J.; OLSEN, R. G. Demonstration of depressed polymorphonuclear leukocyte function in nonviremic FeLV-infected cats. **Cancer investigation**, v. 4, n. 4, p. 297–300, 1986.

LANGHAMMER, S. et al. Antibodies neutralizing feline leukaemia virus (FeLV) in cats immunized with the transmembrane envelope protein p15E. **Immunology**, v. 117, n. 2, p. 229–237, 2006.

LAUNE, D. et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of immunological methods**, v. 267, n. 1, p. 53–70, 2002.

LEVY, J. et al. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 10, n. 3, p. 300–316, 2008.

LEVY, J. K. **FeLV and non-neoplastic felv-related disease**. in SJ Ettinger; EC Feldman (eds), **Textbook of Veterinary internal medicine**. [s.l.] WB, Saunders: Philadelphia, 2000.

LITTLE, S. et al. 2020 AAFP feline retrovirus testing and management guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 1, p. 5–30, 2020.

LUTZ, H. et al. Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Cancer research**, v. 40, n. 10, p. 3642–3651, 1980.

LUTZ, H. et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 11, n. 7, p. 565–574, 2009.

LUTZ, H.; JARRETT, O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 5, p. 827–831, 1987.

LUTZ, H.; PEDERSEN, N. C.; THEILEN, G. H. Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. **American journal of veterinary research**, v. 44, n. 11, p. 2054–2059, 1983.

MACHADO DE AVILA, R. A. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by Tityus serrulatus scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 3, p. 233–241, 2004.

MACKEY, L. et al. Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 54, n. 1, p. 209–217, 1975.

MACY, D. W. Testing cats for feline leukemia virus. **Vet Med Int**, p. 278–288, 1991.

MADEWELL, B. R.; JARRETT, O. Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. **The veterinary record**, v. 112, n. 15, p. 339–342, 1983.

MAJOR, A. et al. Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. **Veterinary research**, v. 41, n. 2, p. 17, 2010.

MARKEY, B. K.; QUINN, P. J. **Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias**. [s.l.] ACRIBIA, 2006

MATHES, L. E. et al. Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. **Cancer research**, v. 39, n. 3, p. 950–955, 1979.

MAZUR, F. A. C. et al. Development of an indirect ELISA for the diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.35, n. 3, p. 241–246, 2013.

MCCAW, D. L. et al. Immunomodulation therapy for feline leukemia virus infection. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 4, p. 356–363, 2001.

MENDOZA, R.; ANDERSON, M. M.; OVERBAUGH, J. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. **Journal of virology**, v. 80, n. 7, p. 3378–3385, 2006.

MIYAZAWA T. Receptors for animal retroviruses. **Uirusu**, v. 59, n. 2, p. 223–242, 2009.

MIYAZAWA, T.; JARRETT, O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. **Archives of virology**, v. 142, n. 2, p. 323–332, 1997.

N. C. PEDERSEN, S. M. MERIC, L. JOHNSON, S. PLUCKER, G. H. THEILEN. The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. **Feline Practice**, Vol. 14, No. 2, 32...48 ref. 23, 1984.

NAVES, J. H. F. **Diagnóstico da anemia infecciosa equina em equinos, asininos e muarees utilizando peptídeo sintético pgp45.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

NAVES, J. H. F. F. et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. **Journal of virological methods**, v. 266, p. 49–57, 2019.

NESINA, S. et al. Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 105, 2015.

O'BRIEN, S. J.; SIMONSON, J. M.; DAVIS, S. Deposition of retrovirus associated antigens (p30 and gp70) on cell membranes of feline and murine leukaemia virus infected cells. **The Journal of general virology**, v. 38, n. 3, p. 483–496, 1978.

OKASINSKI, G. F.; VELICER, L. F. Analysis of intracellular feline leukemia virus proteins II. Generation of feline leukemia virus structural proteins from precursor polypeptides. **Journal of virology**, v. 22, n. 1, p. 74–85, 1977.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O. Duration of the latent state in feline leukaemia virus infections. **The veterinary record**, v. 117, n. 18, p. 472–474, 1985.

PARR, Y. A. et al. Measuring the humoral immune response in cats exposed to feline leukaemia virus. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 428, 2021.

PEPIN, A. C. et al. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral RNA in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. **Virus research**, v. 127, n. 1, p. 9–16, 2007.

PINTER, A.; FLEISSNER, E. Structural studies of retroviruses: characterization of oligomeric complexes of murine and feline leukemia virus envelope and core components formed upon cross-linking. **Journal of virology**, v. 30, n. 1, p. 157–165, 1979.

POULET, H. et al. Efficacy of a canarypox virus-vectored vaccine against feline leukaemia. **The veterinary record**, v. 153, n. 5, p. 141–145, 2003.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. et al. Synthetic Peptides-Based Indirect ELISA for the Diagnosis of Bovine Anaplasmosis. **Intern J Appl Res Vet Med • Vol. 17, No. 2**, 2019.

REINEKE, U. et al. A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 271–275, 1999.

RESENDE, C. F. et al. Indirect ELISA (iELISA) standardization for the diagnosis of bovine enzootic leukosis. **Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]**, v. 40, n. 12, p. 977–984, 2020.

REY, M. A.; PRASAD, R.; TAILOR, C. S. The C domain in the surface envelope glycoprotein of subgroup C feline leukemia virus is a second receptor-binding domain. **Virology**, v. 370, n. 2, p. 273–284, 2008.

RIBEIRO, Y. S. R. **ESTUDO RETROSPECTIVO DAS RETROVIROSES FELINAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO UNIVERSITÁRIO DE MOSSORÓ, RIO GRANDE DO NORTE (2011-2021) MOSSORÓ - Monografia (Graduação)**. [s.l.] Repositório Ufersa, 2022.

ROJKO, J. L. et al. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 63, n. 3, p. 759–768, 1979.

ROJKO, J. L. et al. Reactivation of latent feline leukaemia virus infection. **Nature**, v. 298, n. 5872, p. 385–388, 1982.

ROJKO, J. L.; KOCIBA, G. J. Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1305–1310, 1991.

RUAS, A. C. L. et al. Immunoinformatic predictions and characterization of *Schistosoma mansoni* peptides as candidates for immunodiagnostic. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 111, n. 3, p. 116632, 2024.

RUSSELL, P. H.; JARRETT, O. The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 21, n. 6, p. 768–778, 1978.

SANTOS, C. R. G. **Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia felina e avaliação clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo**. Seropédica: Universidade Federal Rural do rio de Janeiro, 2023.

SHOJIMA, T.; NAKATA, R.; MIYAZAWA, T. Host cell range of T-lymphotropic feline leukemia virus in vitro. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 345, n. 4, p. 1466–1470, 2006.

SILVA, A. DOS S. DA et al. Diagnóstico de infecções virais. In: **Tópicos em Virologia**. [s.l.] Editora Fiocruz, 2023. p. 47–86.

SIQUEIRA, W. F. et al. Immunogenic mapping of rDyn-1 and rKDDR-plus proteins and selection of oligopeptides by immunoblotting for the diagnosis of *Leishmania infantum*-infected dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 17, n. 8, p. e0011535, 2023.

SPARKES, A. H. Feline leukaemia virus and vaccination. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 5, n. 2, p. 97–100, 2003.

SUGIURA, T. et al. Field application of enzyme-linked immunosorbent assay for screening of equine infectious anemia. **Journal of equine science**, v. 6, n. 1, p. 15–20, 1995.

TANDON, R. et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. **Journal of virological methods**, v. 130, n. 1–2, p. 124–132, 2005.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinaria**. 10. ed. [s.l.] Elsevier Editora Ltda, 2019

TOEPERT, F. et al. Combining SPOT synthesis and native peptide ligation to create large arrays of WW protein domains. **Angewandte Chemie (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 115, n. 10, p. 1168–1172, 2003.

TORRES, A. N. et al. Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 81–89, 2008.

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

TUKEY, J. W. **Exploratory Data Analysis**. Upper Saddle River, NJ: Pearson, 1977.

VAN REGENMORTEL, M. H.; PELLEQUER, J. L. Predicting antigenic determinants in proteins: looking for unidimensional solutions to a three-dimensional problem? **Peptide research**, v. 7, n. 4, p. 224–228, 1994.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Synthetic peptide vaccines and the search for neutralization B cell epitopes. Em: **HIV/AIDS: Immunochemistry, Reductionism and Vaccine Design**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 25–37.

VICTOR, R. M. et al. Molecular detection of feline leukemia virus in oral, conjunctival, and rectal mucosae provides results comparable to detection in blood. **Journal of clinical microbiology**, v. 58, n. 2, 2020.

VOGT, V. M. Virions e genomas retrovirais. Em: COFFIN, J.; VARMUS, H. (Eds.). **Retrovírus**. Cold Spring Harbor (NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

WANG, J. J. et al. Detection of antibodies to human T-lymphotropic virus type III by using a synthetic peptide of 21 amino acid residues corresponding to a highly antigenic segment of gp41 envelope protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 6159–6163, 1986.

WEIJER, K.; UIJTDEHAAG, F.; OSTERHAUS, A. Control of feline leukaemia virus infection by a removal programme. **The veterinary record**, v. 119, n. 22, p. 555–556, 1986.

WESTMAN, M. E. et al. Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 50, p. 88–96, 2017.

WESTMAN, M. et al. The diagnosis of feline leukaemia virus (FeLV) infection in owned and group-housed rescue cats in Australia. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 503, 2019.

WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; NORRIS, J. M. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. **Australian veterinary journal**, v. 97, n. 3, p. 47–55, 2019b.

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 195, n. 1, p. 16–23, 2013.

WINKLER, D. F. H. Chemistry of SPOT synthesis for the preparation of peptide macroarrays on cellulose membranes. **Mini-reviews in organic chemistry**, v. 8, n. 2, p. 114–120, 2011.

Anexo 1: Lista de todos os peptídeos sintetizados em membrana de celulose, cobrindo toda a proteína correspondente a região do gene *env* e *gag* do FeLV.

1. <i>env</i>	49.	97.	145.	193.
MESPTHPKPSKDKTL	LVLDPQKPPSRQSQT	FRQLQMAMHTDIQAL	WRSLATDPPSWVRPF	AARRPTNLAQVKQVV
2.	50.	98.	146.	194.
HPKPSKDKTLNLA	QKPPSRQSQTGSKVA	MAMHTDIQALEESIS	TDPPSWVRPFLPPPK	TNLAQVKQVVQGKEE
3.	51.	99.	147.	195.
KDKTLNLAFLVGI	RQSQTGSKVATQRPQ	DIQALEESISALEKS	WVRPFLPPPKPPTPL	VKQVVQGKEETPAAF
4.	52.	100.	148.	196.
SWNLAFLVGILFTID	GSKVATQRPQTNEA	EESISALEKSLTSL	LPPPKPPTPLPQPLS	QGKEETPAAFLERLK
5.	53.	101.	149.	197. F7
FLVGILFTIDIGMAN	TQRPQTNEAAPSVA	ALEKSLTSLSEVVLQ	PPTPLPQPLSPQPSA	TPAAFLERLKEAYRM
6.	54.	102.	150.	198.
LFTIDIGMANPSPHQ	TNEAAPSVAAPTMTG	LTSLSEVVLQNRRGL	PQPLSPQPSAPLTSS	LERLKEAYRMYTPYD
7.	55.	103.	151.	199.
IGMANPSPHQIYNVT	PRSVAPTMTGPKRIG	EVVLQNRRGLDILFL	PQPSAPLTSSLYPVL	EAYRMYTPYDPEDPG
8.	56.	104.	152.	200.
PSPHQIYNVTWVITN	PTTMGPKRIGTGDR	NRRGLDILFLQEGGL	PLTSSLYPVLPKPDP	YTPYDPEDPGQAASV
9.	57.	105.	153.	201.
IYNVTWVITNVQTNT	PKRIGTGDRILNLVQ	DILFLQEGGLCAALK	LYPVLKPDPPKPPV	PEDPGQAASVILSFI
10.	58.	106.	154.	202.
WVITNVQTNTQANAT	TGDRILNLVQGTyla	QEGGLCAALKEECCF	PKPDPPKPPVLPPDP	QAASVILSFIYQSSP
11.	59.	107.	155.	203.
VQTNTQANATSM LGT	INLVQGTylaLNATD	CAALKEECCFYADHT	PKPPVLPPDPSSPLI	ILSFIYQSSPDIRNK
12.	60.	108.	156.	204.
QANATSM LGTTLTDAY	GTylaLNATDPNKT	EECCFYADHTGLVRD	LPPDPSSPLIDLLE	YQSSPDIRNKLQRL
13.	61.	109.	157.	205.
SM LGTTLTDAYPTLHV	LNATDPNKTDCWLC	YADHTGLVRDNMAKL	SSPLIDLLETPPPY	DIRNKLQRLQGLQGF
14.	62.	110.	158.	206. F9
LTDAYPTLHVLDL	PNKTDCWLCCLVSRP	GLVRDNMAKLRLERL	DLLTEEPYPGPGHG	LQRLQGLQGF T L S D L
15.	63.	111.	159.	207. F5
PTLHVLDLCLVGD	DCWLCCLVSRPPYEG	NMAKLRLERLQRRQL	EPPYPGPGHGPPPSG	GLQGF T L S D L L K E A E
16.	64.	112.	160.	208.
LDLCLVGD T W E P I V L	LVSRPPYEGIAILG	RERLQRRQLFDSQQ	PGHGPPPSGPRTP	TLSDLLKEAEKIYNK

17. VGDTWEPIVLNPTNV	65. PYYEGIAILGNYSNQ	113. QRQQLFDSQQGWFEQ	161. PPPSGPRTPTASPIA	209. LKEAEKIYNKRETPE
18. EPIVLNPTNVKHGAR	66. IAILGNYSNQTNPPP	114. FDSQQGWFEQWFNKS	162. F4 PRTPTASPIASRLRE	210. KIYNKRETPEEREER
19. NPTNVKHGARYSSSK	67. NYSNQTNPPPSCLST	115. GWFEQWFNKSFWFTT	163. F1 ASPIASRLRERREN	211. RETPEEREERLWQRQ
20. KHGARYSSSKYGCKT	68. TNPPPSCLSTPQHKL	116. WFNKSFWFTTLISSI	164. SRLRERRENPAESQ	212. EREERLWQRQEERDK
21. YSSSKYGCKTTDRKK	69. SCLSTPQHKLTISEV	117. FWFTTLISSIMGPLL	165. RRENPAESQALPLR	213. LWQRQEERDKKRHKE
22. YGCKTTDRKKQQQTY	70. PQHKLTISEVSGQGM	118. LISSIMGPLLILLI	166. AESQALPLREGPNN	214. EERDKKRHKEMTKVL
23. TDRKKQQQTYPFYVC	71. TISEVSGQMCIGTV	119. MGPLLILLILLFGP	167. ALPLREGPNNRPQYW	215. KRHKEMTKVLATVVA
24. QQQTYPFYVCPGHAP	72. SGQMCIGTVPKTHQ	120. ILLILLFGPCILNR	168. EGPNNRPQYWPFAS	216. MTKVLATVVAQNRDK
25. PFYVCPGHAPSLGPK	73. CIGTVPKTHQALCNK	121. LLFGPCILNRLVQFV	169. RPQYWPFASDLYNW	217. ATVVAQNRDKDREES
26. PGHAPSLGPKGTHCG	74. PKTHQALCNKTQQGH	122. CILNRLVQFVKDRIS	170. PFSASDLYNWKSHNP	218. QNRDKDREESKLGQD
27. SLGPKGTHCGGAQDG	75. ALCNKTQQGHTGAHY	123. LVQFVKDRISVVQAL	171. DLYNWKSHNPPFSQD	219. DREESKLGQQRKIPL
28. GTHCGGAQDGFCAAW	76. TQQGHTGAHYLAAPN	124. KDRISVVQALILTQQ	172. KSHNPPFSQDPVALT	220. KLGQQRKIPLGKDQC
29. GAQDGFCAAWGCFTT	77. TGAHYLAAPNGTYWA	125. VVQALILTQQYQQIK	173. PFSQDPVALTNLIES	221. RKIPLGKDQCAYCKE
30. FCAAWGCFTTGEAWW	78. LAAPNGTYWACNTGL	126. ILTQQYQQIKQYDPD	174. PVALTNLIESILVTH	222. GKDQCAYCKEKGHWV
31. GCFTTGEAWWKPTSS	79. GTYWACNTGLTPCIS	127. <i>env</i> TQQYQQIKQYDPDRP	175. NLIESILVTHQPTWD	223. AYCKEKGHWVRDCPK
32. GEAWWKPTSSWDYIT	80. CNTGLTPCISMAVLN	128. <i>gag</i> MGQTITTPSLSLTLDH	176. ILVTHQPTWDDCQQL	224. KGHWVRDCPKRPRKK
33. KPTSSWDYITVKRGS	81. TPCISMAVLNWTSDF	129. TTPLSLTLDHWSEVR	177. QPTWDDCQQLQALL	225. RDCPKRPRKKPANST
34. WDYITVKRGSSQDNS	82. MAVLNWTSDFCVLIE	130. LTLDHWSEVRARAHN	178. DCQQLQALLTGEER	226. RPRKKPANSTLLNLG

35.	83.	131.	179.	227.gag
VKRGSQDNSCEGKC	WTSDFCVLIELWPRV	WSEVRARAHNQGEV	LQALLTGEERQRVLL	PRKKPANSTLLNLGD
36.	84.	132.	180.	
SQDNSCEGKCNPLVL	CVLIELWPRVTYHQP	ARAHNQGEVRKKKW	TGEERQRVLLEARKQ	
37.	85.	133.	181. F2	
CEGKCNPLVLQFTQK	LWPRVTYHQPEYVYT	QGEVRKKKWITLCE	QRVLLEARKQVPGED	
38.	86.	134.	182. F3	
NPLVLQFTQKGRQAS	TYHQPEYVYTHFAKA	RKKKWITLCEAEWVM	EARKQVPGEDGRPTQ	
39.	87.	135.	183.	
QFTQKGRQASWDGPK	EYVYTHFAKAVRFR	ITLCEAEWVMNVGW	VPGEDGRPTQLPNVI	
40.	88.	136.	184. F6	
GRQASWDGPKMWGLR	HFAKAVRFRREPISL	AEWVMNVGWPREGT	GRPTQLPNVIDETFP	
41.	89.	137.	185. F8	
WDGPKMWGLRLYRTG	VRFRREPISLTVALM	MNVGWPREGTFSLDS	LPNVIDETFP LTRPN	
42.	90.	138.	186.	
MWGLRLYRTGYDPIA	EPISLTVALMLGGLT	PREGTFSLDSISQVE	DETFLTRPNWDFAT	
43.	91.	139.	187.	
LYRTGYDPIALFTVS	TVALMLGGLTVGGIA	FSLDSISQVEKKIFA	LTRPNWDFATPAGRE	
44.	92.	140.	188.	
YDPIALFTVSRQVST	LGGLTVGGIAAGVGT	ISQVEKKIFAPGPYG	WDFATPAGREHLRLY	
45.	93.	141.	189.	
LFTVSRQVSTITPPQ	VGGIAAGVGTGTKAL	KKIFAPGPYGHPDQV	PAGREHLRLYRQLLL	
46.	94.	142.	190.	
RQVSTITPPQAMGPN	AGVGTGTKALLETAQ	PGPYGHPDQVPYITT	HLRLYRQLLLAGLRG	
47.	95.	143.	191.	
ITPPQAMGPNLVLPD	GTKALLETQFRQLQ	HPDQVPYITTWRS LA	RQLLLAGLRGAARRP	
48.	96.	144.	192.	
AMGPNLVLPDQKPPS	LETQFRQLQMAMHT	PYITTWRS LATDPPS	AGLRGAARRPTNLAQ	