



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento e aplicação de Elisa indireto com peptídeo sintético p-p27 e ensaios moleculares para o diagnóstico da Leucemia viral felina (FeLV)

Nathália dos Santos Martins

São Luís – MA

2018

NATHÁLYA DOS SANTOS MARTINS

Desenvolvimento e aplicação de Elisa indireto com peptídeo sintético p-p27 e ensaios moleculares para o diagnóstico da Leucemia viral felina (FeLV)

Tese apresentada ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Abreu Silva

São Luís – MA
2018

dos Santos Martins, Nathálya.

Desenvolvimento e aplicação de Elisa indireto com peptídeo sintético p-p27 e ensaios moleculares para o diagnóstico da Leucemia viral felina FeLV / Nathálya dos Santos Martins. - 2018.

154 f.

Orientador(a): Ana Lúcia Abreu Silva.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

1. ELISA. 2. Peptídeo sintético. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Subtipos. 5. Vírus da leucemia felina.
I. Abreu Silva, Ana Lúcia. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instaurada nos termos do Lei nº 5.153, de 21/08/1964 - São Luís - Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Coordenação Geral - Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos - CEP: 52171-900 Recife-PE
Telefone: (81) 3333-8050, 3333-8051 E-mail: renorbio@ppgp.ufpe.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Nathálya dos Santos Martins

TÍTULO DO PROJETO: "Desenvolvimento e aplicação de Elisa Indireta com peptídeo sintético p-p27 e ensaios moleculares para o diagnóstico da Leucemia viral felina (FeLV)".

PROFESSORA ORIENTADORA: Ana Lúcia Abreu Silva

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profª. Drª. Ana Lúcia Abreu Silva – UEMA (Presidente)	_____	_____
Prof. Dr. Jenner Kallison Fimenta dos Reis – UFMG (Titular)	_____	_____
Prof. Dr. Paulo Vitor Boelro – UFMA (Titular)	_____	_____
Profª. Drª. Joice Cortez de Sá- UNICEUMA (Titular)	_____	_____
Profª. Drª. Alana Lisboa de Sousa – UEMA (Titular)	_____	_____

DATA DA APROVAÇÃO: 21 de março de 2018

HORÁRIO: Às 08:00h.

LOCAL: Auditório do Curso de Medicina / UEMA.

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de ter uma família e amá-la imensamente, por me dá forças para nunca desistir da minha vida profissional, mesmo nos momentos difíceis, que não foram poucos, e, por sempre ouvir minhas orações.

Aos meus pais Jonas Costa Martins (*In memoriam*) e Rosilene dos Santos Martins, por sempre se preocuparem com a minha educação e estudos. Meu pai que se dedicou inteiramente para que eu pudesse ter uma boa educação e que meses antes da sua ida ao encontro com o Nosso Senhor, falou que já estaria com a consciência tranquila para partir, pois eu tinha sido aprovada para o curso de Medicina Veterinária. Minha mãe, abdicando anos da sua vida para ajudar na criação do meu filho e, sobretudo, para que eu pudesse continuar o curso sem dificuldades nos momentos que mais precisei.

Ao meu marido Rudson Almeida de Oliveira e meu filho Christiano Yuri Martins de Oliveira, por tornarem minha caminhada mais tranquila, cheia de paz e com muito amor. São os responsáveis por eu ser essa pessoa hoje, eles me trazem, calma quando preciso, aconchego nos momentos difíceis e sempre me recebem de braços abertos, com um sorriso no rosto, quando preciso me ausentar do laço familiar para me dedicar aos estudos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana Lúcia Abreu Silva pela orientação ao longo desses quatro anos, mais também em outros momentos durante a graduação e mestrado. Obrigada por ser essa pessoa humana, amiga e ao mesmo tempo conselheira da vida e profissional. Foi uma grande oportunidade que tive/tenho e um prazer poder conviver com a senhora durante toda a minha vida profissional. Só tenho a agradecer à Deus.

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis que sempre me recebeu no Retrolab (UFMG) de braços abertos e sem restrições. Obrigada pela paciência em responder meus e-mails, que não foram poucos, em torno de 62 emails durante o doutorado e pelas explicações por telefone quando necessitava. O meu imenso agradecimento por me proporcionar aprendizado das técnicas de biologia molecular, ensaios sorológicos, pelos ensinamentos, artigos enviados e ter me inserido na rotina do laboratório com confiança, acreditando que pudesse fluir na pesquisa.

Ao professor Rudson Almeida de Oliveira que me ensinou com muita cautela os princípios da estatística desde o mestrado e por ter me guiado ao longo dessa jornada me ensinando como aplicar à pesquisa o conhecimento adquirido. Obrigada pelas longas noites de paciência para elaboração de toda a estatística do trabalho.

Aos professores do Programa Rede Nordeste de Biotecnologia (UFMA), pelos ensinamentos transmitidos e pelas dúvidas sanadas, em especial, ao professor coordenador do programa Lívio Martins Costa Júnior, que dedica seu tempo em prol da melhoria do curso estando sempre disposto a nos ajudar. Aos professores Vítor Soeiro e Marcus Paes pela disponibilidade dos laboratórios para realização das leituras do Elisa. À professora Mayara Ingrid, que foi suplente da minha qualificação e mesmo assim ajudou bastante com sugestões para o trabalho, dedicando parte do seu tempo comigo.

À minha querida amiga Ana Paula Sousa Rodrigues, que sempre esteve disponível para me ajudar, dedicou parte do seu tempo para me ajudar na padronização da PCR e me recebeu e cuidou de mim quando fui à BH. Sinceros agradecimentos a essa pessoa meiga, tranquila e que sempre diz: Deus é bom o tempo todo! Palavras são insuficientes para expressar o que sinto por ela. Deus coloca anjos em nossas vidas! Ela foi o anjo que sempre me acompanhou e me ajudou até aqui!

Agradecimento especial à Luana Luz Reis, Luciana Luz Alves do Genbimol (UEMA) que ajudaram com paciência para delinear a árvore filogenética e a matriz de distância.

Às colegas da turma do Renorbio, Iara Oliveira, Gisele Cutrim, Aldilene, Wanda Lima, Fábio França, Euler Sauaia, com os quais convivi durante esses anos nas disciplinas -- dividindo momentos agradáveis e troca de conhecimento.

A UEMA pela formação profissional, em especial à professora Alana Lislea que muito contribuiu em meus primeiros passos na pesquisa. A professora Alcina Vieira pela disponibilidade em ajudar na pesquisa. Ao Laboratório de Anatomopatologia e Patologia Molecular, incluindo todos que me ajudaram, Renata Mondêgo, Milena Oliveira, Anderson Cássio, Joanna Albuquerque, Alessandra Lima, Tatiane Aranha e Larissa Sarmiento.

Ao Hospital Veterinário Universitário Francisco Edilberto Uchôa Lopes, pela colaboração em disponibilizar amostras previamente coletadas e testadas, principalmente ao médico veterinário Leandro Macêdo que sempre avisava sobre as coletas.

A Joanna Albuquerque, que me ajudou bastante nas coletas e processamento das amostras, independente do dia e horário. Seu apoio foi essencial para transformar momentos de estresse em alegria.

Aos abrigos e clínicas particulares, pelas amostras coletadas.

Ao Retrolab – UFMG, por toda a equipe que colaborou na concretização da pesquisa, principalmente a atenciosa Juliana Bicalho pela ajuda, explicações nos momentos que necessitei, a Cláudia Fideles pela atenção no treinamento disponibilizado no período de estágio para a concretização do Elisa, a Telissa por ter me recebido e ajudado a compreender algumas técnicas no laboratório.

Aos proprietários dos animais, que aceitaram as coletas do material para realização do projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa e apoio à pesquisa.

Ao Renorbio por proporcionar o intercâmbio com a UFMG.

A Coordenação da Rede Nordeste em Biotecnologia, pela disponibilidade em sempre nos atender.

" Deem graças ao Senhor, porque ele é bom. O seu amor dura para sempre "

(Salmo 136:1)

Martins, N.S. Desenvolvimento e aplicação de Elisa indireto com peptídeo sintético p-p27 e ensaios moleculares para o diagnóstico da Leucemia viral felina (FeLV) [tese]. São Luís, Renorbio, Universidade Federal do Maranhão; 2018.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva

RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) pertence à família *Retroviridae*, gênero *Gammaretrovirus*. A proteína do core viral p27 é produzida em alta quantidade nas células infectadas, sendo encontrada no citoplasma e fluidos corporais. Embora os testes diagnósticos sejam de alta sensibilidade, deve-se realizar mais de um teste para confirmação, principalmente os sorológicos, devido a característica variável do progresso da infecção. Os objetivos desta pesquisa foram desenvolver e padronizar um ELISA indireto utilizando um peptídeo sintético p-p27 baseado no gene *gag* para o diagnóstico da leucemia viral felina (FeLV) e avaliar co-infecções. Para detecção do antígeno p27 do FeLV e anticorpos para FIV, 80 amostras foram testadas com kit comercial de ensaio imunoenzimático rápido FIV/FeLV Test kit (AlereTM) e confirmados por (ELISA - SNAP[®] Combo FeLV/FIV). Amostras de fezes foram submetidas a testes para detecção do antígeno da panleucopenia e coronavírus felino utilizando kits comerciais Panleucopenia Felina Ag Test Kit e Coronaviruse Felina Ag Test Kit (AlereTM). Para confirmação da presença do DNA proviral foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de um fragmento alvo de 450, 235 e 166pb do gene *gag* do FeLV. Os subtipos do FeLV foram identificados por meio da *nested*-PCR para FeLV-A, B e C. Os resultados mostram que do total de 80 amostras examinadas, 5,0% (4/80) eram positivas para FeLV, 15% (12/80) para FIV, 2,50% (2/80) para coronavírus e 0% (0/80) para panleucopenia. Infecção concomitante (FIV/FeLV) foi observada em 1,25% (1/80) dos animais. Os principais sinais clínicos observados foram: halitose, salivação intensa, gengivoestomatite, faringite, sangramento oral, ulcerações em porção dorsal e lateral da língua, lesões em arco glossopalatino, caquexia, letargia, diarreia e co-infecções (sinais respiratórios), além de alterações reprodutivas (hidrossalpingite e congestão uterina), nefropatia e hepatopatia. A *nested* PCR revelou que as quatro amostras positivas para FeLV amplificaram para os subtipos A e B, demonstrando uma combinação AB e nenhuma para o subtipo C e/ou ABC. A análise filogenética identificou similaridade (78% de *bootstrap*) para FeLV-AB, aos subtipos ocorrentes na Ásia oriental (Japão) e sudeste da Ásia (Malaysia), demonstrando ser um subtipo altamente variável geneticamente, caracterizando um subtipo circulante com genótipo diferenciado. O ELISA indireto foi desenvolvido com um peptídeo solúvel linear com 16 resíduos de aminoácidos, o p-p27 foi eficiente em detectar anticorpos anti-FeLV em felinos naturalmente infectados, podendo ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico.

Palavras-chave: Vírus da leucemia felina. Reação em cadeia da polimerase. ELISA. Subtipos. Peptídeo sintético.

Martins, N.S. Development and application of indirect Elisa with synthetic p-p27 peptide and molecular assays for the diagnosis of feline viral leukemia (FeLV) [Thesis]. São Luís, Renorbio, Universidade Federal do Maranhão; 2018.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva

ABSTRACT

Feline Leukemia Virus belongs to *Retroviridae* Family, gender *Gammaretrovirus*. The viral protein p27 is highly produced in the infected cells, and is found in the cytoplasm and corporal fluids. Although diagnostic tests are highly sensitive, is necessary to perform more than one test to confirm the infection, mainly serological ones, due to the variable characteristic of the progress of the infection. The aim of this work was to develop and standardize an indirect ELISA using a synthetic peptide p-p27, based on gag gene for the diagnosis of Feline Leukemia Virus (FeLV) and to evaluate co-infections. For the detection of FeLV antigen p27 and FIV antibodies, 80 samples were tested with a commercial kit (FIV/FeLV Test kit -AlereTM) and confirmed with ELISA (ELISA - SNAP[®] Combo FeLV/FIV). Stool samples were used for the detection of antigens for panleukopenia and feline coronavirus (Panleucopenia Felina Ag Test Kit and Coronavirose Felina Ag Test Kit (AlereTM)). To confirm the presence of proviral DNA, a polymerase chain reaction was performed, for amplification of fragments of 450, 235 and 166 bp of FeLV gag gene. FeLV subtypes were detected through *nested-PCR*. Results showed that, of the 80 samples, 4 (5%) were positive for FeLV, 12 (15%) for FIV, 2 (2,5%) for Coronavirus and none for panleukopenia. The main clinical signs observed were: halitosis, intense salivation, gingivostomatitis, pharyngitis, oral bleeding, ulcerations on the dorsal and lateral portions of the tongue, glossopalatine arch lesions, cachexia, lethargy, diarrhea and co-infections (respiratory signs) (hydrosalpingitis and uterine congestion), nephropathy and liver disease. *Nested-PCR* revealed that the four FeLV positive samples amplified for subtypes A and B, demonstrating an AB combination and none for subtype C and / or ABC. Phylogenetic analysis identified a similarity (78% *bootstrap*) for FeLV-AB, to subtypes occurring in East Asia (Japan) and Southeast Asia (Malaysia), demonstrating that it is a highly genetically variable subtype, characterizing a circulating subtype with a differentiated genotype. The indirect ELISA was developed with a linear soluble peptide with 16 amino acid residues. p-p27 was efficient in detecting anti-FeLV antibodies in naturally infected felines and could be an auxiliary tool in the diagnosis.

Keywords: feline leukemia virus. Polymerase chain reaction. ELISA. Subtypes. Synthetic peptide.