



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUISA PADOVANI

**OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM LONDRINA, PARANÁ**

Londrina
2017

LUISA PADOVANI

**OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Padovani, Luisa.

Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em Londrina, Paraná / Luisa Padovani. - Londrina, 2017.
58 f. : il.

Orientador: Marcelo de Souza Zanutto.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Gato - Doenças - Londrina (PR) - Tese. 2. Gato - Infecções - Tese. 3. Vírus da imunodeficiência felina - Tese. I. Zanutto, Marcelo de Souza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

LUISA PADOVANI

**OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
FELINA EM LONDRINA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Daniel Moura Aguiar
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

Londrina, 06 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof.Dr. Marcelo de Souza Zanutto não só pela constante orientação, mas sobretudo pela paciência, pelo aprendizado e pela oportunidade para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Agradeço ao professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu, pela colaboração essencial para a conclusão do trabalho intitulado “Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina (FIV) em Londrina, Paraná”.

Agradeço à Camila Dantas Malossi, doutoranda em Biotecnologia, no Laboratório de Diagnóstico Molecular, UNESP- Botucatu, pelos ensinamentos práticos e teóricos que foram fundamentais para a realização do trabalho que pesquisou a ocorrência do subtipo do vírus da imunodeficiência felina em Londrina, Paraná.

Agradeço aos co-autores dos trabalhos, que contribuíram para a realização dos trabalhos.

Aos meus pais, Reinaldo e Regina, que nunca mediram esforços para que eu pudesse concluir o mestrado.

Às minhas irmãs, Marina e Lígia, por todo o apoio durante o curso.

Ao meu namorado, Rafael, por sempre estar ao meu lado, por torcer por mim e, principalmente por ter tido paciência comigo durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis e Prof. Dr. Daniel Moura Aguiar por aceitarem avaliar este trabalho.

Ao Hospital Veterinário da Uel, aos professores, funcionários e residentes que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

PADOVANI, Luisa. **Ocorrência do subtipo V do vírus da imunodeficiência felina em Londrina, Paraná.** 58 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Foram apresentados três produtos finais, separados por capítulos, ao Programa de Pós Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias. O primeiro trabalho, é um capítulo de livro, sobre o vírus da imunodeficiência felina (FIV) que descreve aspectos da etiologia, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos, prognóstico, diagnóstico, tratamento, prevenção e controle do vírus. O segundo trabalho, é um artigo, formatado nas normas da revista “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia” (ABMVZ), intitulado “Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em Londrina, Paraná” O vírus da imunodeficiência felina (FIV) infecta gatos, e causa insuficiência progressiva do sistema imune. O FIV é dividido em cinco subtipos (A, B, C, D e E), de acordo com a diversidade genética da região v3-v5 do gene env ou da região p17 – p-24 do gene gag. O conhecimento da diversidade genética pode auxiliar no conhecimento da patogenia e da epidemiologia da doença. Assim, o presente trabalho investigou a ocorrência do subtipo do vírus em gatos oriundos de Londrina, Paraná. Foi realizado o sequenciamento de 168pb do gene gag de amostras coletadas de 13 animais, cujos resultados foram analisados pelo método de substituição nucleotídica Tamura-Nei. A análise filogenética demonstrou que todas as amostras pertenciam ao subtipo B. Esse resultado confirma que até o presente momento, apenas o subtipo B foi encontrado no Brasil. O terceiro trabalho, é um artigo sobre o relato de 3 casos de insulinoma canino aceito para publicação na revista “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência felina. Subtipo. Insulinoma.

PADOVANI, Luisa. **Occurrence of subtype B of the feline immunodeficiency virus in Londrina, Paraná.** 58 p. 2018. Dissertation (Professional Master's degree in Veterinary Clinics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Three final products were presented, separated by chapters, to the Postgraduate Program Professional Master in Veterinary Clinics. The first work is a book chapter on the feline immunodeficiency virus (FIV) that describes aspects of the etiology, epidemiology, pathogenesis, clinical signs, prognosis, diagnosis, treatment, prevention and control of the virus. The second work, is an article, formatted in the norms of the "Brazilian Archive of Veterinary Medicine and Zootechnics" (ABMVZ), entitled "Occurrence of subtype B of the feline immunodeficiency virus in Londrina, Paraná" The feline immunodeficiency virus (FIV) Infects cats, and causes progressive failure of the immune system. FIV is divided into five subtypes (A, B, C, D and E) according to the genetic diversity of the v3-v5 region of the *env* gene or the p17-p-24 region of the *gag* gene. Knowledge of genetic diversity may help in understanding the pathogenesis and epidemiology of the disease. Thus, the present work investigated the occurrence of the virus subtype in cats from Londrina, Paraná. Sequence of 168bp of the *gag* gene from samples collected from 13 animals was performed, whose results were analyzed by the Tamura-Nei nucleotide substitution method. Phylogenetic analysis demonstrated that all samples belonged to subtype B. This result confirms that up to the present moment, only subtype B has been found in Brazil. The third paper is an article on the report of 3 cases of canine insulinoma accepted for publication in the journal "Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia".

Keywords: Feline immunodeficiency virus. Subtype. Insulinoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 –	INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV).....	12
Figura 1 –	Gato infectado pelo FIV, SRD, de onze anos com cicatriz em ponte nasal e pavilhão auricular direito decorrente de brigas (HV-UEL, 2010).....	15
Figura 2 –	Mesmo gato da Figura 1 com pioderma e abscesso na região massetéica direita desencadeado por brigas (HV-UEL, 2010).....	15
Figura 3 –	Diagrama demonstrativo do Ciclo Celular do VIF.....	17
Figura 4 –	Fases da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina.....	18
Figura 5 –	Imagem da cavidade oral de gato infectado pelo VIF, SRD, de oito anos com lesões ulcero-proliferativas em região caudal da cavidade oral (fauce) (HOSPMEV-UFBA, 2005).....	20
Figura 6 –.	Imagem da cavidade oral do mesmo gato da Figura 5 com enantema gengival (HOSPMEV-UFBA, 2005).....	21
CAPÍTULO 2 –	OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM LONDRINA, PARANÁ.....	32
Figura 1 –	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining obtida através da análise de 13 sequências de nucleotídeos do gene gag do vírus da imunodeficiência felina do Paraná-Brasil. Números de acesso Genbank: Petaluma (M25381.1), Fukuoka (D37822.1), Aomori 1 (D37823.1), Sendai 2 (D37821.1), Maryland (AF361320.1), ItalyM3 (Y13866.1), TM2 (M59418.1), Yokohama (D37819.1), Aomori 2 (D37824.1), Shizuoka (D37818.1), San Diego (M36968.1), British Columbia (AF474246.1), 1027 (EU117992.1).....	38

CAPÍTULO 3 –	INSULINOMA CANINO – RELATOS DE CASOS.....	43
Figura 1 –	A) Fragmento de pâncreas e duodeno, com nódulo pancreático (*) após ressecção cirúrgica. B) Cortes transversais seriados de duodeno com infiltração neoplásica em serosa e muscular (seta) a partir de nódulo pancreático (*). C) Visão aproximada dos três primeiros segmentos observados em “B” com destaque para as áreas de infiltração neoplásica na parede do duodeno (setas) oriunda do nódulo pancreático (asterisco preto) e sua relação com o pâncreas normal (asterisco branco)	47
Figura 2 –	Cão, pâncreas, carcinoma de células β. A) Pâncreas. Ninhos e trabéculas de células epiteliais com citoplasma vacuolizado, eosinofílico permeando ácidos exócrinos (*). HE, 200X. B) Neoformação pancreática. Ninhos e trabéculas bem delimitados por tecido fibrovascular delicado, compostos por células epiteliais com pleomorfismo celular e nuclear discretos, núcleos redondos com nucléolos geralmente presentes, únicos e pequenos (setas). HE, 400X	48
Figura 3 –	Cão, pâncreas, carcinoma de células β. A) Discreta neoformação circular, esbranquiçada,protruindo do parênquima pancreático. B) Observa-se neoformação infiltrando o estroma pancreático (*) a partir de uma capsula fibrosa que delimita parcialmente o tumor (seta). HE, 100x. C) Neoformação caracterizada por ninhos de células epiteliais com citoplasma eosinofílico e núcleos redondos, delimitados por septos fibrovasculares. HE, 200x	49
Figura 4 –	Cão, pâncreas, carcinoma de células β. A) Neoformação pancreática (*) delimitada e septada por tecido fibrovascular espesso produzindo um aspecto lobulado no menor aumento. HE, 25x. B) Linfonodo peripancreático (*) parcialmente substituído pelo tecido neoplásico (seta). HE, 100x.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPÍTULO 1 – INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)

FIV –	Vírus da imunodeficiência felina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
SRD	Sem raça definida
HV	Hospital veterinário
UEL	Universidade Estadual de Londrina
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária
UFBA	Universidade Federal da Bahia
PCR	reação em cadeia de polimerase
SC	subcutânea
AZT	3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina
PO	Via oral
IFN- α	Interferon alfa recombinante humano

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM LONDRINA, PARANÁ

FIV	Vírus da imunodeficiência felina
UEL	Universidade Estadual de Londrina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
HV	Hospital Veterinário
PCR	Reação em cadeia de polimerase

CAPÍTULO 3 – INSULINOMA CANINO – RELATOS DE CASOS

IV	Intra venoso
RJ	Rio de Janeiro
HV	Hospital Veterinário
UEL	Universidade Estadual de Londrina
IGF-1	fator de crescimento semelhante á insulina tipo 1
GH	hormônio de crescimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)	12
INTRODUÇÃO	13
ETIOLOGIA	13
EPIDEMIOLOGIA	14
PATOGENIA	16
SINAIS CLÍNICOS	19
PROGNÓSTICO	21
DIAGNÓSTICO	21
TRATAMENTO	23
PREVENÇÃO E CONTROLE	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2 - OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM LONDRINA, PARANÁ	31
RESUMO	32
ABSTRAC	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO 3 - INSULINOMA CANINO – RELATOS DE CASOS	43
RESUMO	44
ABSTRAC	44
INTRODUÇÃO	45
RELATOS DE CASOS - CASO 1	46
CASO 2	48
CASO 3	50
DISCUSSÃO	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

ANEXOS	55
ANEXO A – Carta convite para escrever o capítulo do livro	56
ANEXO B – Protocolo da comissão de ética no uso de animais	57
ANEXO C – Carta de aceite da revista ABMVZ.....	58

**CAPÍTULO 1 - INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)**

Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)

M.V. Luisa Padovani

M.V. Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência felina (do inglês “feline immunodeficiency vírus” - FIV) foi descrito na Califórnia, Estados Unidos, em 1986 por Pedersen et al (1987)¹, e desde então vários estudos têm sido realizados para determinar a sua distribuição². No Brasil o vírus foi identificado pela primeira vez em 1993³.

O FIV infecta gatos, causa insuficiência progressiva do sistema imune do hospedeiro, podendo levar a síndrome da imunodeficiência adquirida (“AIDS felina”)⁴. É importante ressaltar que os humanos não são susceptíveis à infecção pelo FIV⁵.

ETIOLOGIA

O FIV é um retrovírus do gênero *Lentivirus* que está intimamente relacionado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ambos são estruturalmente semelhantes e possuem ciclo de vida e patogenicidade também similares, mas antigenicamente distintos⁶.

Os lentivírus são complexos contendo genes acessórios *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* do FIV codifica proteínas estruturais como matriz (MA), p24 do capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC), que são importantes para o diagnóstico. O gene *pol* codifica a protease, integrase e a transcriptase reversa, assim como outras enzimas que são importantes para a virulência do vírus. O gene *env* codifica a glicoproteína viral (gp120) e a proteína transmembrana (gp41), que são os principais determinantes da diversidade entre os isolados virais⁵.

Em todo o mundo, cinco subtipos principais do vírus, geneticamente distintos (A a E) são descritos com considerável divergência (até 26%) principalmente no gene *env*⁵. Além disso, novos subtipos foram descritos em gatos do Texas (subtipo

F), Nova Zelândia e Portugal⁶. No Brasil, estudos epidemiológicos realizados nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul relataram a ocorrência do subtipo B do vírus^{7,8,9,10}.

O vírion tem 105-125nm de diâmetro, possui forma esférica a helicoidal e um envelope externo com projeções pouco definidas. A partícula viral é constituída por duas fitas simples de RNA não complementares, idênticas, de polaridade positiva com 9,4 kilobases¹.

Devido as características estruturais, o FIV sobrevive apenas alguns minutos fora do hospedeiro e é susceptível a maioria dos desinfetantes incluindo o sabão comum⁵.

EPIDEMIOLOGIA

O FIV encontra-se amplamente disseminado em todo o mundo, e as taxas de prevalência variam em diferentes regiões^{2,6}. No Brasil, estudos epidemiológicos realizados nas cidades de Belo Horizonte, São Paulo, Rio de Janeiro e no estado do Rio Grande do Sul, demonstraram uma variação de 4% a 37,5% nas taxas de prevalência^{11,12,13,14}, sendo que os menores valores foram relatados em gatos assintomáticos e os maiores em gatos doentes.

A prevalência do vírus no hospedeiro depende do sexo, forma de criação e do estado de saúde dos gatos. O risco de infecção pelo FIV é significativamente maior em gatos adultos machos do que em fêmeas e animais jovens e, isso pode ser explicado pela diferença no comportamento social dos felinos, já que as feridas por mordedura constituem o modo mais frequente na transmissão do vírus (Figuras 1 e 2)



Figura 1: Gato infectado pelo FIV, SRD, de onze anos com cicatriz em ponte nasal e pavilhão auricular direito decorrente de brigas (HV-UEL, 2010).

FONTE: Marcelo de Souza Zanutto.



Figura 2: Mesmo gato da Figura 1 com pioderma e abscesso na região massetérica direita desencadeado por brigas (HV-UEL, 2010).

FONTE: Marcelo de Souza Zanutto.

Os gatos semi-domiciliados, com acesso à rua, têm maior taxa de infecção em comparação com os gatos domiciliados, sem acesso ao exterior e castrados^{2,4,5}.

A frequência da infecção é geralmente menor em gatos saudáveis do que em gatos doentes⁶.

A transmissão vertical pode ocorrer no útero, durante o parto ou pela ingestão do colostro e do leite¹⁵. Os filhotes podem se tornar persistentemente infectados, dependendo do título viral da progenitora durante a gravidez e no parto⁵.

Embora a transmissão oronasal e venérea não tenham sido documentadas em infecção natural, os gatos foram infectados experimentalmente por inoculação do vírus na cavidade nasal e oral, vagina e reto⁵. O vírus também pode ser encontrado no sêmen⁵. A transmissão por fômites ou por excreções encontradas no ambiente é pouco provável pela baixa viabilidade viral no ambiente. Além dos gatos, o FIV já foi isolado em diversos felinos não domésticos como pumas, leões e leopardos⁵.

PATOGENIA

Os principais alvos da infecção pelo FIV são os linfócitos T CD4+ ativados. Essas células também conhecidas como células T auxiliares, têm um papel central na função imune, tanto na imunidade humoral, produção de anticorpos, quanto celular⁵. Diferente do HIV que tem como receptor primário o CD4, o FIV tem como receptor primário o CD134, também conhecido como OX40, um membro da família dos receptores dos fatores de necrose tumoral (TNF), que é altamente expresso nas células T CD4+ ativadas¹⁶. A glicoproteína 120 (gp120) localizada no envelope do vírus se liga ao receptor primário na superfície da célula, o CD134 (OX40) e essa ligação promove alterações no envelope viral que favorecem uma segunda interação com o co-receptor, CXCR4, resultando-se assim na fusão viral à membrana celular e a entrada do vírus na célula hospedeira¹² (Figura 3). A região genética do envelope (env) de lentivírus sofre mutações rapidamente e exibe grande diversidade genética⁵.

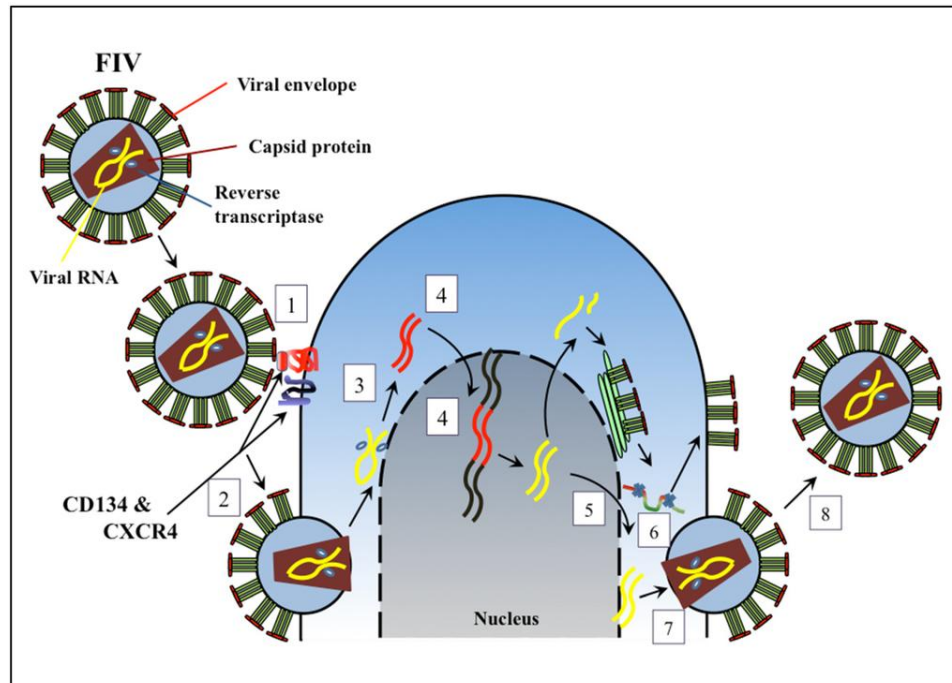


Figura 3: Diagrama demonstrativo do Ciclo Celular do FIV. 1: Adsorção - penetração: a entrada da partícula viral é mediada pela ligação de glicoproteínas do envelope ao receptor celular CD134 e ao co-receptor CXCR4. 2: Desnudamento - o material genético do vírus e suas enzimas são liberadas no citoplasma celular. 3: Transcrição reversa - o RNA viral sofre transcrição reversa, produzindo DNA dupla fita. 4: Entrada no núcleo e integração ao DNA do gato - o DNA viral junto com proteínas virais como a integrase migram para o núcleo. O DNA viral integra-se então no genoma da célula hospedeira felina, sendo denominado de pró-vírus. 5: Transcrição e saída dos RNAs mensageiros do núcleo - a transcrição do DNA pró-viral realizada pela RNA polimerase celular origina transcritos, que são exportados para o citoplasma da célula. 6: Tradução - os transcritos são traduzidos por ribossomos no retículo endoplasmático, gerando as proteínas virais como a Gag, polimerase, do envelope, outras enzimas e proteínas estruturais. 7: Morfogênese - os componentes dos vírions são envelopados, inclusive o RNA viral. 8: Brotamento - as partículas virais brotam da célula hospedeira pela fusão com a membrana celular.

Embora a diminuição do número de células T CD4+ seja a marca da infecção pelo FIV, o vírus pode infectar uma variedade de tipos de células em seus hospedeiros, como os linfócitos T CD8+, linfócitos B, células de linhagem neuronal, monócitos, macrófagos e células dendríticas^{4,17}.

A infecção experimental pelo FIV também progride através de vários estágios, semelhante à infecção pelo HIV no homem, incluindo uma fase aguda, uma fase clinicamente assintomática, e uma fase terminal, por vezes, chamada "síndrome de imunodeficiência adquirida" (AIDS). No entanto, não há distinção clara entre estes estágios em gatos naturalmente infectados pelo FIV¹⁸.

Nos primeiros dias após a infecção experimental, o FIV se replica em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4+, e dentro de duas semanas é detectado no plasma. O pico de título viral ocorre entre oito a doze semanas após o início da infecção. A perda de células CD4+ leva à inversão da relação CD4/CD8⁴, embora com a evolução da infecção os linfócitos T CD8+ também diminuam gradualmente⁴. A diminuição dos títulos virais marca o início da fase assintomática que pode durar anos. Durante este tempo, a disfunção progressiva do sistema imune ocorre lentamente⁴. O período assintomático pode evoluir para o estágio caracterizado por uma variedade de distúrbios associados à síndrome de imunodeficiência que pode resultar na morte dos animais. Nesta última fase há um aumento do título viral^{5,19}. Diferente das pessoas infectadas pelo HIV, gatos classificados em "fase de AIDS", ou seja, título viral elevado e sinais clínicos graves decorrentes de infecções secundárias, podem se recuperar e se tornar assintomáticos novamente, e sua carga viral pode até diminuir drasticamente¹⁸ (Figura 4).

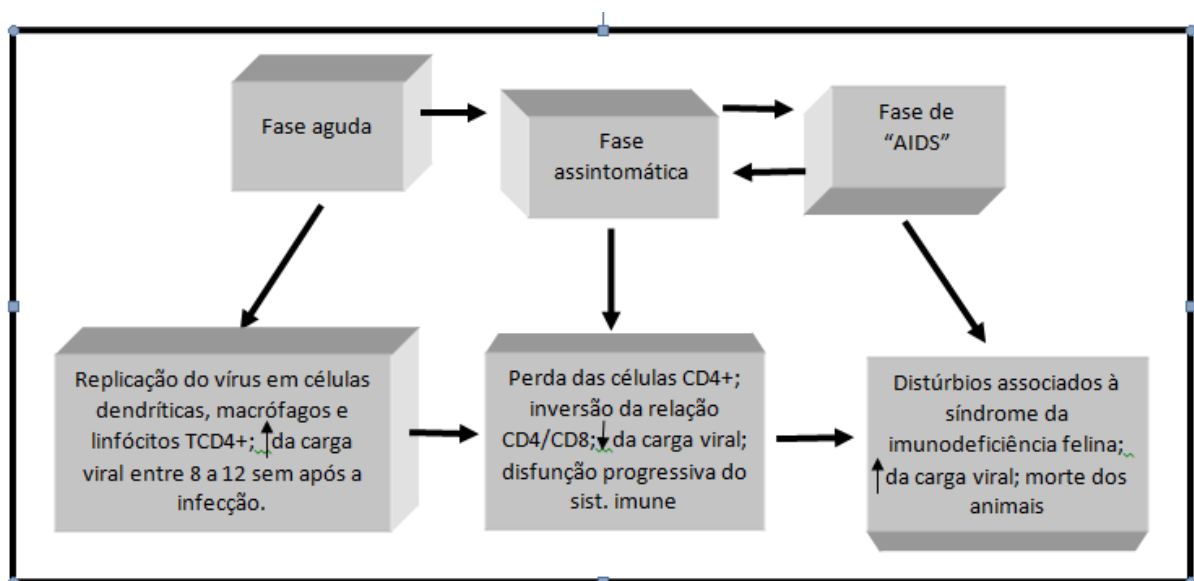


Figura 4: Imunopatologia da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina em diferentes fases.

Apesar da resposta imune rápida e vigorosa dos hospedeiros infectados pelo vírus, essa resposta é incapaz de eliminar a infecção, e o gato continua infectado pelo resto da vida⁵. A infecção torna-se latente quando as células apresentam o pró-vírus integrado no DNA celular, porém não há produção de partículas virais, a menos que a célula seja ativada. Células com infecção latente representam um "reservatório" de infecção que não é atingido por anticorpos neutralizantes²⁰.

Demonstrou-se diferenças de virulência entre os subtipos geneticamente distintos de FIV que circulam em gatos domésticos^{19,21}.

SINAIS CLÍNICOS

A maioria das manifestações clínicas não é desencadeada diretamente pelo FIV, mas em decorrência de afecções e infecções secundárias, que devem ser identificadas e tratadas⁵.

Os sinais clínicos nas infecções pelo FIV são variáveis de acordo com a fase. Na primeira fase ou fase aguda, os sinais clínicos são transitórios e leves, e incluem febre, letargia, enterite, estomatite, dermatite, conjuntivite, doença do trato respiratório e linfadenomegalia generalizada^{18,19}. Esta fase pode durar vários dias a algumas semanas. Entretanto, por causa da ausência de sinais ou por serem muito discretos, a fase aguda da infecção viral pode passar despercebida, o que dificulta o estabelecimento precoce do diagnóstico^{18,22}.

A duração da segunda fase, ou fase assintomática, é variável. Entretanto, geralmente é prolongada e pode durar anos, dependendo da virulência do isolado infectante, do subtipo do FIV, exposição a agentes patogênicos secundários, e a idade do gato no momento da infecção¹⁸.

Na última fase, ou fase sintomática de infecção (AIDS), os sinais clínicos são um reflexo de infecções oportunistas, neoplasia, mielossupressão e doenças neurológicas^{18,19}. A consequência clínica mais importante da infecção pelo FIV é a imunossupressão caracterizada pela perda do repertório imunológico que leva a uma condição de anergia, ou seja, ausência de resposta humoral e celular mediada. A imunossupressão pode predispor não só a doenças infecciosas secundárias, representando a maioria dos sinais clínicos, mas também pode levar a uma diminuição dos mecanismos de vigilância imunológica frente a células neoplásicas e

causar um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias⁵. Gatos infectados com FIV têm cerca de cinco vezes maior probabilidade de desenvolver linfoma ou leucemia do que os gatos não infectados¹⁸.

Gatos infectados com retrovírus também podem desenvolver doenças mediadas pelo sistema imunológico provocadas por uma resposta imune exagerada. A resposta imune mediada mais comum é uma hipergamaglobulinemia causada por uma resposta excessiva humoral contra infecções crônicas persistentes^{5,18}. Os anticorpos produzidos não são neutralizantes e, por conseguinte, pode levar à formação de complexos antígeno-anticorpos. Estes complexos imunes podem se depositar em leitos capilares estreitos, causando glomerulonefrite, poliartrite, uveíte, e vasculite¹⁸.

O complexo gengivite-estomatite úlcero-proliferativa (Figuras 5 e 6) é muito comum nas infecções pelo FIV, sendo encontrado em até 50% dos gatos infectados. Na maioria das vezes essa alteração está associado a outras infecções, como o calicivírus^{18,19}.

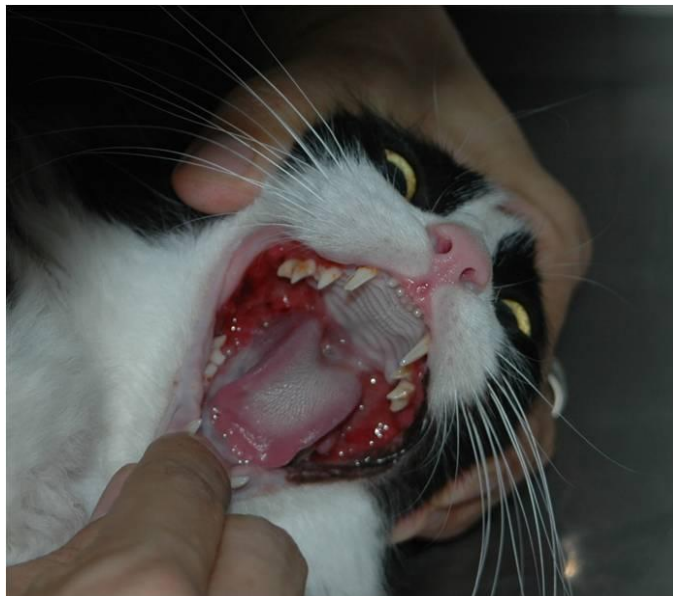


Figura 5: Cavidade oral de gato infectado pelo FIV, SRD, de oito anos com lesões ulcero-proliferativas em região caudal da cavidade oral (fauce) (HOSPMEV-UFBA, 2005).

FONTE: Marcelo de Souza Zanutto.



Figura 6: Cavidade oral do mesmo gato da Figura 5 com enantema gengival (HOSPMEV-UFBA, 2005).

FONTE: Marcelo de Souza Zanutto.

Os sinais neurológicos têm sido descritos em gatos infectados e incluem espasmos em face e língua, comportamento psicótico, andar compulsivo, demência, perdas do controle de micção e defecação, além de perturbações do sono. Outros sinais descritos incluem nistagmo, ataxia, convulsões e tremores de intenção¹⁹.

PROGNÓSTICO

O prognóstico da infecção varia de favorável a desfavorável. Embora o FIV possa ocasionar a AIDS felina, na maioria dos gatos infectados o período para chegar a essa fase é longo, por isso, os gatos infectados quando tratados podem viver por anos e ocasionalmente morrerem por causas não relacionadas à infecção retroviral^{19,23,24}.

DIAGNÓSTICO

Devido à variedade e inespecificidade de sinais clínicos, o diagnóstico clínico da doença é impossível. Gatos que apresentam infecções crônicas ou recidivantes, perda de peso, distúrbios digestórios, respiratórios, oftalmológicos ou neurológicos, alterações hematológicas e neoplasias devem ser submetidos a testes laboratoriais para o diagnóstico preciso²².

Diversas alterações clinico-patológicas foram descritas em gatos infectados, mas nenhuma é específica ou patognomônica para a infecção⁶. Esses animais podem ter uma variedade de citopenias. A anemia, geralmente arregenerativa, linfopenia e neutropenia podem ser observadas, embora estas anormalidades podem ser decorrente de infecções concomitantes em consequência da infecção pelo vírus^{6,25}. Em estudo recente, 25% dos gatos infectados apresentaram neutropenia²⁵. Trombocitopenia e combinações de citopenias, incluindo pancitopenia já foram observadas em gatos infectados assintomáticos na ausência de outras causas identificadas^{6,25}. Alguns gatos podem apresentar alterações bioquímicas como hiperproteinemia por hipergamaglobulinemia²⁵.

São diversos os métodos diagnósticos para o FIV. O ensaio de reação em cadeia pela polimerase (PCR) detecta, através de amostras de sangue total, o DNA proviral⁵. A PCR associada ao sequenciamento genético pode ser utilizada com finalidade epidemiológica para a identificação de subtipos do vírus predominante em determinada região. O conhecimento da diversidade genética de cepas circulantes é fundamental para a produção e validação de testes diagnósticos que se baseiam na pesquisa de material genético do vírus e no uso racional de vacinas específicas^{4,5,6}. Resultados falso-negativos na PCR podem ocorrer pela inadequação das amostras, erro no emparelhamento entre os iniciadores (*primers*) e as sequencias virais, quando há insuficiente quantidade do vírus na amostra ou inadequada preparação dos componentes da reação de PCR²⁶.

O método por detecção direta é realizado quando se busca o antígeno através do isolamento do vírus, em sangue total heparinizado, sendo um método diagnóstico confiável, porém bastante trabalhoso e não é utilizado rotineiramente^{4,5,6}.

Os diagnósticos de rotina são realizados por meio da detecção indireta⁴, são os testes sorológicos, que utilizam amostras de soro ou plasma, para detecção de anticorpos que reconhecem proteínas estruturais do vírus (proteína p24 e p15) e uma das glicoproteínas do envelope viral, a gp41²⁷. Esses testes rápidos para triagem podem ser encontrados na forma de ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunocromatografia. O Western Blot é considerado o teste sorológico “padrão ouro” e é utilizado para confirmação de testes inconclusivos. Neste teste, o vírus é primeiramente purificado e suas proteínas separadas em um gel de eletroforese. Desta maneira, as proteínas podem ser detectadas por anticorpos específicos presentes nos soros dos animais infectados. Amostras contendo anticorpos que se

ligam em uma ou mais proteínas são interpretadas como reagentes para FIV^{5,27}. Resultados falso-negativos podem ocorrer no início da infecção, já que os gatos produzem anticorpos anti-FIV, em média, dentro de 60 dias após exposição; também podem ocorrer nas fases terminais da doença, devido à anergia do sistema imune, que leva a baixos títulos de anticorpos. Quando a infecção recente não pode ser descartada, o teste deve ser repetido no mínimo após 60 dias da exposição potencial²².

Os resultados dos testes de triagem (rápidos) devem ser interpretados cuidadosamente. Quando é encontrado um resultado positivo em um animal com baixo risco de infecção, em uma população de baixa prevalência, o resultado deve ser confirmado por novos testes, como Western Blot ou a PCR. Já o resultado positivo em um gato criado em alto risco, tem um valor preditivo alto, ou seja, é provável que se trate realmente de um animal infectado²⁷.

A presença de anticorpos maternos em filhotes nascidos de mães infectadas pelo FIV pode resultar em testes falso-positivos. Portanto, os testes devem ser realizados após 16 semanas de idade, tempo suficiente para eliminação dos anticorpos maternos. Em alguns casos, os anticorpos maternos podem persistir por mais de 16 semanas e, desta maneira, um novo teste deve ser realizado dois meses após o primeiro²⁸. A PCR neste caso pode ser utilizada para a confirmação da infecção. A vacinação com vírus inativado leva a uma rápida produção de anticorpos nos gatos, o que também pode resultar em testes falso-positivos, entretanto essa vacina não é comercializada no Brasil²⁸.

TRATAMENTO

Na maioria das vezes, o tratamento é de suporte para as afecções concomitantes e secundárias. Os gatos infectados respondem bem as medicações, embora possa ser necessário um tratamento mais longo e agressivo com antibióticos, por exemplo, quando se compara aos gatos doentes não infectados com FIV^{4,5}.

Alguns autores relatam benefícios clínicos com o uso de corticosteroides e outros fármacos imunossupressores em gatos infectados com estomatite crônica, mas a sua utilização é controversa devido aos seus efeitos colaterais. Em casos de

estomatite grave e refratária, a extração dos dentes é preferida sobre a utilização a longo prazo de corticosteroides^{4,5}.

A griseofulvina não deve ser utilizada em infecções fúngicas secundárias por causar supressão da medula^{4,5}. Quando há mielossupressão, a filgrastina, um fator de estimulação de colônias de granulócitos humana recombinante (rhuG-CSF), tem sido utilizada em gatos com neutropenia profunda na dose de 5µ/Kg uma vez ao dia, por via subcutânea (SC), até 21 dias. A medicação pode aumentar as contagens de neutrófilos, mas pode também levar a um aumento da carga viral⁵.

A eritropoietina está disponível como produto recombinante humano e é utilizada em gatos com FIV que apresentam anemia arregenerativa, na posologia de 100 UI/kg SC a cada 48 horas até que o volume globular desejado seja atingido. Observa-se um aumento gradual nas contagens de hemácias e inclusive de leucócitos^{5,6}.

O tratamento específico para o FIV é estudado não só para ajudar os gatos infectados, mas também para os benefícios potenciais para humanos infectados pelo HIV. Diagnóstico rápido e preciso é essencial para permitir a intervenção terapêutica precoce e um desfecho de tratamento bem sucedido⁴. O tratamento inclui quimioterapia antiviral e terapia imunomoduladora para gatos infectados sintomáticos e cuidados de suporte⁶.

Hoje a terapia antirretroviral é o pilar do tratamento em pacientes infectados pelo HIV⁷. Infelizmente, muitos dos agentes antivirais utilizados em seres humanos são tóxicos para gatos ou ineficazes e existem poucos estudos controlados para apoiar a sua utilização clínica^{5,6}. O AZT (3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina), conhecido como zidovudina, é um análogo de nucleosídeo (derivado de timidina), que bloqueia a transcriptase reversa do retrovírus e inibe a replicação de FIV *in vitro* e *in vivo*^{5,6}. Seu uso pode reduzir a carga viral plasmática e melhorar além do estado clínico e imunológico, a qualidade de vida desses animais^{5,6}. Em um estudo controlado com placebo, o AZT melhorou a estomatite em gatos naturalmente infectados²⁹. A dose indicada é de 5 a 10 mg/kg via oral (PO) ou SC a cada 12 horas. Para a aplicação SC, o produto liofilizado deve ser diluído em solução isotônica de cloreto de sódio para evitar a irritação local⁵. Durante o tratamento, o hemograma deve ser realizado semanalmente durante o primeiro mês, devido ao efeito colateral representado pela anemia arregenerativa que ocorre principalmente em doses elevadas^{5,6}. Se a

anemia não for constatada, avaliações mensais são suficientes. Alguns gatos podem desenvolver uma ligeira diminuição do hematócrito, nas primeiras três semanas, que se resolve mesmo que o tratamento continue. Gatos com supressão da medula óssea não devem ser tratados^{5,6}. Se o hematócrito cair abaixo de 20%, o tratamento deve ser descontinuado, e a anemia, geralmente se resolve dentro de alguns dias. Tal como no HIV, os FIV mutantes resistentes ao AZT podem surgir após seis meses do início do tratamento⁶. A lamivudina (3TC) também é um inibidor da transcriptase reversa que pode ser utilizada na mesma posologia da zidovudina, com a vantagem de induzir menos frequentemente anemia. Os antirretrovirais não são disponibilizados para o uso veterinário⁵, inclusive no Brasil, médicos veterinários não têm permissão para prescreverem antirretrovirais.

Terapias imunomoduladoras são utilizadas para aumentar a imunidade em gatos infectados sintomáticos. Imunomoduladores tais como acemanan, proteína A de *Staphylococcus* e *Propionibacterium acnes* podem ser utilizados com intuito hipoteticamente de restaurar a função imune comprometida, o que permitiria ao paciente controlar a carga viral e melhora da síndrome clínica associada à doença. Entretanto, não há estudos controlados que comprovem a eficácia dessas medicações⁶.

Os interferons são citocinas com atividade antiviral, imunomoduladora e anti-tumoral, espécie-específicos. O interferon alfa recombinante humano (IFN- α), administrado por via oral, pode induzir um estado antiviral nas células e também apresentar efeito imunomodulador. Por ser espécie específico o seu uso em gatos é bastante controverso⁵. A administração parenteral de IFN- α parece ser mais eficaz do que pela via oral. O IFN- α pode ser administrado em doses elevadas (10^5 a 10^6 UI/kg) por até seis ou sete semanas pela via subcutânea. Alternativamente, o interferon humano pode ser administrado por via oral em doses baixas, porém como ele não será absorvido pelo trato gastrointestinal, acredita-se que sua atuação ocorra pela estimulação do tecido linfóide local na cavidade oral. A dose utilizada é de 10 UI/kg a cada 24 horas, durante sete dias em semanas alternadas durante seis meses, seguido de uma pausa de dois meses, e, em seguida, repete-se mais seis meses de tratamento⁶. O interferon ômega felino é uma citocina que está comercialmente disponível em alguns países europeus e no Japão e, pode ser utilizado durante toda a vida do animal sem induzir anticorpos. Além disso, os efeitos

colaterais não foram relatados em gatos. Esta citocina é ativa contra FIV *in vitro*, mas no único estudo controlado realizado em gatos a campo, não houve melhora significativamente das taxas de sobrevivência³⁰.

PREVENÇÃO E CONTROLE

A castração dos gatos infectados deve ser realizada, com o intuito de diminuir a agressividade desses gatos e, portanto, diminuir o risco de transmissão⁵. Os gatos infectados com FIV não devem ter acesso à rua, para diminuir o risco de infecção para outros gatos e para evitar que esses animais infectados adquiriram outras doenças infecciosas^{4,31}. Se um gato é diagnosticado com infecção pelo FIV, todos os gatos da casa devem ser testados^{4,31}.

Geralmente, os gatos de domicílios com estabilidade social apresentam baixo risco para infecção⁴. Se um gato infectado é identificado em uma casa com grande quantidade de gatos ou em um gatil, o melhor método de prevenção da transmissão para outros gatos é isolar o animal infectado para evitar a interação desses animais⁴. Se a separação não for possível, nenhum gato deve ser introduzido no ambiente para reduzir o risco de agressão territorial⁴.

Como o FIV pode ser transmitido verticalmente por mães infectadas, gatas também devem ser esterilizadas se a sua condição clínica for estável para a realização da cirurgia⁴.

A prevalência de infecções retrovirais nos ambientes controlados de gatis parece ser baixa, contudo, é necessária vigilância constante para prevenir a introdução do vírus ao gatil. Deve-se ter cuidado em colocar os filhotes com gatos mais velhos, evitar o contato próximo de outros gatos durante o acasalamento e a introdução ocasional de novos gatos. Apenas gatos saudáveis devem ser utilizados para a reprodução, e deve ser conhecido o estado de infecção para retrovírus de todos os gatos no gatil. Gatas que saírem do gatil para acasalamento devem ser testadas antes de deixar o gatil e, quando retornam devem ser mantidas em quarentena, e testadas novamente em 60 dias^{4,5,31}.

Quando o teste é realizado pela primeira vez no gatil, todos os animais devem ser negativos em dois testes com 60 dias de intervalo e os gatos infectados devem

ser removidos dos gatis. Todos os gatos recém adquiridos devem ser colocados em isolamento e testado para FIV assim que chegam ao local. Idealmente, eles devem permanecer isolados até que um segundo teste negativo for obtido após 60 dias^{4,5}.

Os gatos infectados com FIV devem ser submetidos a exames clínicos a cada seis meses pelo menos e monitorados quanto à perda de peso. Exames laboratoriais de rotina devem ser considerados⁵.

Em gatis que seguem diretrizes de testes e se mantem soronegativos para retrovírus, a imunização contra FIV não é necessária. A imunização contra o FIV não é recomendada, porque a infecção é incomum nesses gatis e a imunização pode interferir com o resultado dos testes⁴.

A imunização contra o FIV é difícil porque as vacinas não induzem imunidade protetora ampla contra as estirpes ou clades do vírus. Vacinas desenvolvidas com um único subtipo protegem contra a infecção homóloga, mas podem falhar na proteção contra cepas divergentes que apresentem mais de 20% de diferença nas sequências do gene *env*. Apenas uma única vacina está atualmente disponível para prevenção da infecção pelo FIV^{4,6}, mas ela não é comercializada no Brasil. A vacina é dupla (subtipos A e D), composta pelo vírus inteiro inativado combinado com um adjuvante que induz a uma rápida produção de anticorpos. No entanto, um estudo demonstrou imunidade protetora de 12 meses contra uma estirpe do subtipo B com a utilização da vacina dupla. Nesse experimento 10 dos 14 gatos vacinados foram completamente protegidos contra a infecção³². A vacina está licenciada para a imunização de gatos saudáveis com oito semanas de idade ou mais velhos. Esta vacina está disponível na Austrália, Nova Zelândia e no Japão, mas não está licenciada na Europa, foi retirada do mercado americano em 2016 e não deve ser utilizada onde se desconhece os subtipos prevalentes locais ou regionais do vírus, como é o caso do Brasil. A vacina para FIV não é essencial e pode ser considerada para gatos cujo estilo de vida os coloque em alto risco de infecção, tais como gatos com acesso à rua que brigam ou gatos que vivem com gatos infectados. O protocolo de três doses é administrado por via subcutânea com três semanas de intervalo. A revacinação anual é recomendada subsequente à primeira série se o risco de infecção continua. Os clientes devem ser informados de que os gatos vacinados terão resultados reagentes em testes sorológicos. Os gatos devem ser testados e devem ser não reagentes para a infecção antes de serem vacinados⁴.

A imunização de rotina de gatos infectados pelo FIV contra outros agentes é controversa. Gatos infectados assintomáticos nas fases iniciais da infecção podem desenvolver uma forte resposta imune após a vacinação⁵. No entanto, não se sabe se gatos nas fases posteriores, e aqueles mostrando imunodeficiência, irão desenvolver uma resposta adequada à vacinação. Se for optado pela imunização deve-se utilizar vacinas inativadas. A estimulação imune causada pela vacina pode levar à progressão da doença, dado que a estimulação de linfócitos *in vitro* é conhecida por promover a produção do vírus. Assim, os riscos e benefícios de imunizar gatos infectados pelo FIV devem ser ponderados caso-a-caso⁵.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - PEDERSEN, N.C.; HO, E.W.; BROWN, M.L.; YAMAMOTO, J.K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency- like syndrome. **Science**, v.235, n.479, p.790-793, 1987.
- 2 - 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, p.985-992, 2009.
- 3 - HAGIWARA, M.K.; RECHE JUNIOR, A.; DAGLI, M.L.Z. Feline immunodeficiency virus infection in cats from Sao Paulo, Brazil. **Braz. Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.30, p.217-220, 1993.
- 4 - LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, p.300-316, 2008.
- 5 - HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, W.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTAMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Feline immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, n.7, p.575-584, 2009.
- 6 - SELLON, R.K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: Greene C.E. **Infectious Diseases of The Dog and The Cat**. 4ed. United States: Elsevier, p.136-149, 2012.
- 7 - TEIXEIRA, B.M. **Identificação e caracterização do vírus da imunodeficiência felina de amostras obtidas de felinos mantidos em um abrigo na cidade de São Paulo**. 2010. 750f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.
- 8 - CAXITO, F.A.; COELHO, F.M.; OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency vírus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.30, n.8, p.953-956, 2006.

- 9 - MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P.; SCHATZMAYR, H.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.M. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v.82, n.16, p.7863-7874, 2008.
- 10 - SILVA, F.S.; CASTRO, C.C.; FINGER, P.F.; SILVA, D.S.; TANIWAKI, S.A.; ULMANN, L.S.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D.; LIMA, M.; ARAÚJO, J.P.; HUBNER, S.O. Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.1-6, 2014.
- 11 - LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAUJO JUNIOR, J.P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciencia. Rural.**, v. 38, p. 2245-2249, 2008.
- 12 - SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Epidemiological study of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic cats in the city of Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária.**, v. 36, p.14-21, 2002.
- 13 - TEIXEIRA, B.M.; RAJÃO, D.S.; HADDAD, J.P.A., et al. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.59, p. 939-942, 2007.
- 14 - CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A.. et al. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.20, p.20-25, 2000.
- 15 - LISTER, A.L. Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. (Special Issue: Feline infectious diseases). **Veterinary Journal**, v.201, p.184-188, 2014.
- 16 - SHIMOJIMA, M.; MIYAZAWA, T.; IKEDA, Y.; MCMONAGLE, E.L.; HAINING, H.; AKASHI, H.; TAKEUCHI, Y.; HOSIE, M.J.; WILLETT, B.J. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. **Science**, v.303, p.1192–1195, 2004.
- 17 - JOSHI, A.; GARG, H.; TOMPKINS, M.B.; TOMPKINS, W.A. Preferential feline immunodeficiency virus (FIV) infection of CD4+ CD25+ T-regulatory cells correlates both with surface expression of CXCR4 and activation of FIV long terminal repeat binding cellular transcriptional factors. **Journal of Virology**, v.79, p.4965-4976, 2005.
- 18 - HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**. v.4, p.2684-2710, 2012.
- 19 - HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, p.190-201, 2011.
- 20 - MCDONNELL, S.J.; SPARGER, E.E.; MURPHY, B.G. Feline immunodeficiency virus latency. **Retrovirology**, v.10, n.69, p.1-8, 2013.
- 21 - TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; SAMMAN, A.; MIYASHIRO, S.I.; BRANDÃO, P.E.; WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J.; HAGIWARA, M.K. Isolation and partial characterization of Brazilian samples of feline immunodeficiency virus. **Virus Research**, v.160, p.59-65, 2011.

- 22 - ZANUTTO, M.S.; FROES, T.R.; TEIXEIRA, A.L.; HAGIWARA, M.K. Características clínicas da fase aguda da infecção experimental de felinos pelo vírus da imunodeficiência felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.255-260, 2011.
- 23 - BECZKOWSKI, P.M.; LITSTER, A.; LIN, T.S.; MELLOR, D.J.; WILLETT, B.J.; MARGARET J. HOSIE M.J. Contrasting clinical outcomes in two cohorts of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). **Veterinary Microbiology**, v.176, p.50–60, 2015.
- 24 - BIENZLE D. FIV in cats – a useful model of HIV in people? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.159, p.171-179, 2014.
- 25 - GLEICH, S.; HARTAMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.552-558, 2009.
- 26 - BORST, A.; BOX, A.T.; FLUIT, A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.23, n.4, p.289-299, 2004.
- 27 - CRAWFORD, C; LEVY, J.K. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.37, n.2, p.335-350, 2007.
- 28 - LEVY, J.K.; CRAWFORD, P.C.; SLATER, M.R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n.10, p.1558-1561, 2004.
- 29 - HARTMANN, K.; DONATH, A.; KRAFT, W. AZT in the treatment of feline immunodeficiency virus infection. Part 2. **Feline Practice**, v.6, p.13–20, 1995.
- 30 - DE MARI, K.; MAYNARDI, L.; SANQUER, A.; LEBREUX, B.; EUN, HM. Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (Felv)-infected and Felv/ feline immunodeficiency virus (FIV) coinfecting symptomatic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.477-482, 2004.
- 31 - MÖSTL, K.; EGBERINK, H.; ADDIE, D.; FRYMUS, T.;BOUCRAUT-BARALON, C.;TRUYEN, U.; HARTMANN, K.;LUTZ, H.; GRUFFYDD-JONES, T .; RADFORD, A.D.; LLORET, A.; PENNISI, M.G.;HOSIE, M.J.; MARSILIO, F.; THIRY, E.; BELÁK, S.;HORZINEK, M.C. ABCD guidelines on prevention of infectious diseases in cat shelters. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, p. 546–554, 2013.
- 32 - HUANG, C.; CONLEE, D.; GILL, M.; CHU, H.J. Dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine provides 12 months of protective immunity against heterologous challenge. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p.451-457, 2010.

**CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA
DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM
LONDRINA, PARANÁ.**

OCORRÊNCIA DO SUBTIPO B DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM
LONDRINA, PARANÁ
OCCURRENCE OF SUBTYPE B OF THE FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN
LONDRINA, PARANÁ

Luisa PADOVANI^{1*}; Camila Dantas MALOSSI²; João Pessoa ARAÚJO JR³; Eduardo Yudi Hashizume⁴; Marcelo de Souza ZANUTTO⁵.

^{1*}Pós-graduanda *stricto sensu* Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), luisapadovani1@hotmail.com.

²Pós-graduanda *stricto sensu* Doutorado em Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular, UNESP-Botucatu,

³Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP – Botucatu,

⁴Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Veterinária, Centro Universitário Filadélfia (Unifil,)

⁵Departamento de Clínicas Veterinárias, Setor de Clínica Médica de Animais de Companhia, HV-UEL.

RESUMO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) infecta gatos, e causa insuficiência progressiva do sistema imune. O FIV é dividido em cinco subtipos (A, B, C, D e E), de acordo com a diversidade genética da região v3-v5 do gene *env* ou da região p17 – p-24 do gene *gag*. O conhecimento da diversidade genética pode auxiliar no conhecimento da patogenia e da epidemiologia da doença. Assim, o presente trabalho investigou a ocorrência do subtipo do vírus em gatos oriundos de Londrina, Paraná. Foi realizado o sequenciamento de 168pb do gene *gag* de amostras coletadas de 13 animais, cujos resultados foram analisados pelo método de substituição nucleotídica Tamura-Nei. A análise filogenética demonstrou que todas as amostras pertenciam ao subtipo B. Esse resultado confirma que até o presente momento, apenas o subtipo B foi encontrado no Brasil.

Palavras – chave: vírus da imunodeficiência felina, gato, subtipo.

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) infects cats, and causes progressive failure of the immune system. FIV is divided into five subtypes (A, B, C, D and E) according to the genetic diversity of the v3-v5 region of the *env* gene or the p17-p-24 region of

the gag gene. Knowledge of genetic diversity may contribute to understanding the pathogenesis and epidemiology of the disease. Thus, the present work investigated the occurrence of the FIV subtype in cats from Londrina, Paraná. Sequence of 168bp of the gag gene from samples collected from 13 animals was performed, whose results were analyzed by the Tamura-Nei nucleotide substitution method. Phylogenetic analysis demonstrated that all samples belonged to subtype B. This result confirms that up to the present moment, only subtype B has been found in Brazil.

Keywords: immunodeficiency feline virus, cat, subtype.

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi descrito na Califórnia, Estados Unidos, em 1986 por Pedersen et al (1987). No Brasil o vírus foi reconhecido pela primeira vez em 1993 (Hagiwara et al., 1993). O FIV é um retrovírus do gênero *Lentivirus* que infecta gatos e causa insuficiência progressiva do sistema imune, semelhante ao observado em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Pedersen et al., 1989).

A prevalência da infecção varia entre as localizações geográficas e a população de gatos avaliada. Alguns países como a Itália e o Japão, com alta densidade populacional de gatos de vida livre, possuem taxas de infecção elevadas (Ishida et al., 1989; Bandecchi et al., 1992). No Brasil, um estudo realizado na cidade de São Paulo, avaliou 454 felinos e demonstrou que 14,7% destes estavam infectados (Lara et al., 2008). No município do Rio de Janeiro, um estudo epidemiológico, testou 126 gatos e 16,6% foram positivos (Souza et al., 2002), e em Belo Horizonte, Minas Gerais, dos 145 gatos testados, 4,14% estavam infectados (Teixeira et al., 2007). No Rio Grande do Sul, um estudo constatou uma taxa de infecção de 37,5% (Caldas et al., 2000), porém as 40 amostras testadas eram provenientes de gatos sintomáticos, com suspeita de imunodeficiência, o que pode explicar a alta prevalência no estado.

O FIV é classificado em cinco subtipos diferentes (A, B, C, D e E) com base na diversidade genética da região v3-v5 do gene *env* (Sodora et al., 1994; Kakinuma et al., 1995; Pecoraro et al., 1996). Outros estudos mostraram ser possível a mesma classificação genética para o FIV através da sequência de nucleotídeos da região

p17-p24 do gene *gag* (Kakinuma et al., 1995; Hohdatsu et al., 1998; Steinrigl e Klein, 2003; Duarte e Tavares, 2006). Recentemente, foram descritos dois novos subtipos, o subtipo F, detectado nos Estados Unidos e Portugal, e o subtipo U-NZenv, encontrado na Nova Zelândia (Weaver et al., 2004; Duarte e Tavares, 2006; Hayward et al., 2007).

Os subtipos A, B e C estão mundialmente distribuídos. O subtipo D é encontrado no Japão e Vietnã (Kakinuma et al., 1995; Nakamura et al., 2003), e o subtipo E foi identificado somente na Argentina (Pecoraro et al., 1996). No Brasil, a caracterização molecular do vírus foi realizada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, onde apenas o subtipo B foi identificado (Caxito et al., 2006; Martins et al., 2008; Lara et al., 2007; Silva et al., 2014). No Distrito Federal, um suposto novo subtipo do FIV foi identificado (Marçola et al., 2013). Além disso, estudos recentes demonstraram a ocorrência de subgrupos dentro do subtipo B (Weaver et al., 2004; Caxito et al., 2006; Duarte e Tavares, 2006; Steinrigl et al., 2010; Teixeira et al., 2010). A combinação de um ou mais subtipos também já foi descrita (Bęczkowski et al., 2014).

O conhecimento da variabilidade genética do FIV é fundamental no desenvolvimento de vacinas que induzam imunidade protetora a subtipos específicos, além, de possibilitar a associação de subtipos do FIV com o quadro clínico apresentado pelo paciente (Teixeira et al., 2010B). Estudos de infecção experimental demonstraram haver diferença na virulência entre os subtipos (Pedersen et al., 2001; de Rozieres et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi determinar e caracterizar o subtipo viral do FIV em gatos domésticos oriundos do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, da cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL, protocolo CEUA número 3760.2016.82 (Anexo B).

Durante o período de fevereiro de 2007 a outubro de 2016, 63 gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), de diversas raças e idades, sintomáticos e assintomáticos, não vacinados, foram avaliados e

confirmados como positivo para FIV em teste rápido por ensaio imunoenzimático (Snap FIV/FeLV combo test - IDEXX). Esses gatos foram testados diante da suspeita da infecção pelo FIV pela sintomatologia apresentada, como teste de triagem para introdução de novos gatos ou por serem contactantes de gatos infectados. Os testes rápidos foram realizados nesses animais no momento do primeiro atendimento, e não foram repetidos posteriormente.

Em 2016, dos 63 gatos reagentes, 25 foram convocados a retornar ao HV, 14 gatos eram sintomáticos e 11 assintomáticos, e tiveram amostras de sangue coletadas, que foram encaminhadas para a confirmação do diagnóstico, por meio da reação em cadeia de polimerase (nested PCR e quantitativa) e para o sequenciamento genético, no Laboratório de Diagnóstico Molecular, Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Unesp – Botucatu. Foi possível colher amostra de 25, dos 63 gatos reagentes para infecção por FIV nos testes rápidos, porque 27 desses animais vieram à óbito ou desapareceram e, 11 deles não tiveram as amostras colhidas porque os proprietários, por diversos motivos, não retornaram ao HV-UJEL.

As amostras sanguíneas desses gatos foram obtidas por punção venosa, acondicionadas em frascos contendo anticoagulante EDTA e armazenadas a 4°C. A extração do DNA proviral foi obtida utilizando-se o Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. O DNA obtido foi armazenado a -20°C.

A PCR quantitativa (qPCR) padronizada com um fluoróforo intercalante de DNA (SYBR) utiliza-se dos primers qFIV 5 – deg (RTGGTTYACAGCCTTYTCDGC) e q FIV A5- deg (GGGTACGATCATAYTCWGCTGTCA), com bases degeneradas para amplificar todos os subtipos virais de FIV. Cada reação foi realizada num volume total de 20µl contendo: 10 uL de Go Taq Master Mix (Promega), 0,4 uL de cada oligonucleotídeo específico a 10 uM e 4,2 uL de água nuclease-free foram adicionados a 5uL das amostras de DNA. A reação foi realizada no aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies), com o programa térmico que consiste em uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de uma desnaturação por 15 s a 95 °C e anelamento e extensão por 60 s a 60 °C. Ao final da reação uma curva de dissociação é lida através da ciclagem 95°C por 15s, 60°C por 1min, leitura a 1% até 95°C por 30s, 60°C por 15s.

Para a PCR nested foram utilizados primers correspondentes à região p17 e p24 do gene *gag*, descritos por Hohdatsu et al. (1998). A primeira reação amplifica

uma sequência de nucleotídeos de 228 pares de base (pb) e a segunda reação, uma de 168 pb. A reação de PCR foi realizada num volume total de 25µl contendo: 12,5 uL de 2X GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 uL de cada primer a 10 pmol/uL, 5 uL de amostra de DNA e água nuclease-free para completar a reação. As condições de ciclagem eram uma desnaturação inicial por 6 minutos à 95°C, e 35 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 1 minuto a 72°C, seguidos por 10 minutos de extensão final a 72°C. A reação de Nested-PCR consistia em 25 uL, sendo 12,5 uL de 2X GoTaq Green Master Mix (Promega), 1 uL de cada primer a 10 pmol/uL, 1 uL do produto do PCR anterior e água nuclease-free para completar a reação, com uma ciclagem de uma incubação inicial a 95°C por 7 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, seguidas de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final da reação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) e corado com 1 uL de SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Scientific) para cada 10mL de gel. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) no fotodocumentador Fluor Chem FC2 (Alpha Innotech) e comparados com marcadores de massa molecular de 100pb (Ludwig Biotec). Incluíram-se em todas as reações amostras contendo água ultrapura como controle negativo e uma amostra de DNA, extraída de sangue total de um gato naturalmente infectado, como controle positivo.

Os produtos da PCR nested que apresentaram fragmento esperado de 168pb foram purificados utilizando beads magnéticas Agencourt® AMPure® XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, USA). Em seguida, foram submetidos ao sequenciamento bidirecional direto utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme orientação do fabricante. Apenas fragmentos com alta qualidade (quality value > 20) foram utilizados para a determinação da sequência *consensus* através do Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3.

As sequências de nucleótidos de 168pb do gene *gag* das 13 amostras foram alinhadas com CLUSTAL_W (Thompson et al., 1997). A relação filogenética entre as sequências de cada região genômica foi inferida pelo método de Tamura Nei (Tamura e Nei, 1993) com uma distribuição gama de 0,26 que foi determinada como

o modelo de evolução mais adequado para a substituição de nucleotídeos usando MODELTEST (Posada e Crandall, 1998). A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 6 para Windows (Kumar et al., 2004) usando o método de neighbor joining (Saitou e Nei, 1987). A análise de bootstrap foi utilizada com 1000 repetições para validar a consistência da árvore.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 25 gatos que tiveram amostras de sangue coletadas em 2016, 19 foram positivas na PCR quantitativa, em tempo real, e tiveram o diagnóstico de FIV confirmados e 6 foram negativos. Os 6 animais que foram negativos na PCR quantitativa eram assintomáticos no momento do exame. O resultado negativo desta PCR nesses gatos, pode ser explicado, pela menor carga viral nos pacientes assintomáticos e portanto, uma quantidade insuficiente do vírus na amostra (Barlough et al., 1991) ou por um resultado falso-positivo nos testes rápidos que são testes sorológicos de rotina, realizados por ensaio imunoenzimático, considerados teste de triagem no diagnóstico de FIV e que tem 92 a 99 % de especificidade e 92 a 94% de sensibilidade (Crawford, 2010). Estudos epidemiológicos demonstraram uma maior prevalência da infecção em pacientes sintomáticos comparados com os pacientes assintomáticos (Caldas et al., 2000; Souza et al., 2002; Lara et al., 2008).

Os pacientes sintomáticos, no momento do teste rápido, apresentavam alterações como gengivoestomatite, gastroenterite crônica, micoplasmose, paraparesia, complexo respiratório felino, glomerulonefrite, icterícia, anemia arregenerativa e leucocitose persistente.

As 19 amostras positivas na PCR quantitativa, foram submetidas à reação de PCR nested para amplificação do DNA e, para posterior sequenciamento genético e, 13 apresentaram fragmento esperado de 168pb e puderam ser sequenciadas. A PCR quantitativa, foi realizada para um diagnóstico mais rápido e prático durante a rotina e por ter uma sensibilidade maior em relação a PCR nested, o que explica um número menor de animais positivos nessa segunda técnica (Sellon e Hartmann, 2012).

Os números do GenBank de adesão dos subtipos A, B, C, D e E do FIV utilizados para o alinhamento das sequências obtidas são mostrados na Fig 1. As 13

amostras da cidade de Londrina que foram submetidas ao sequenciamento genético neste trabalho foram alocadas dentro do subtipo B (Figura 1).

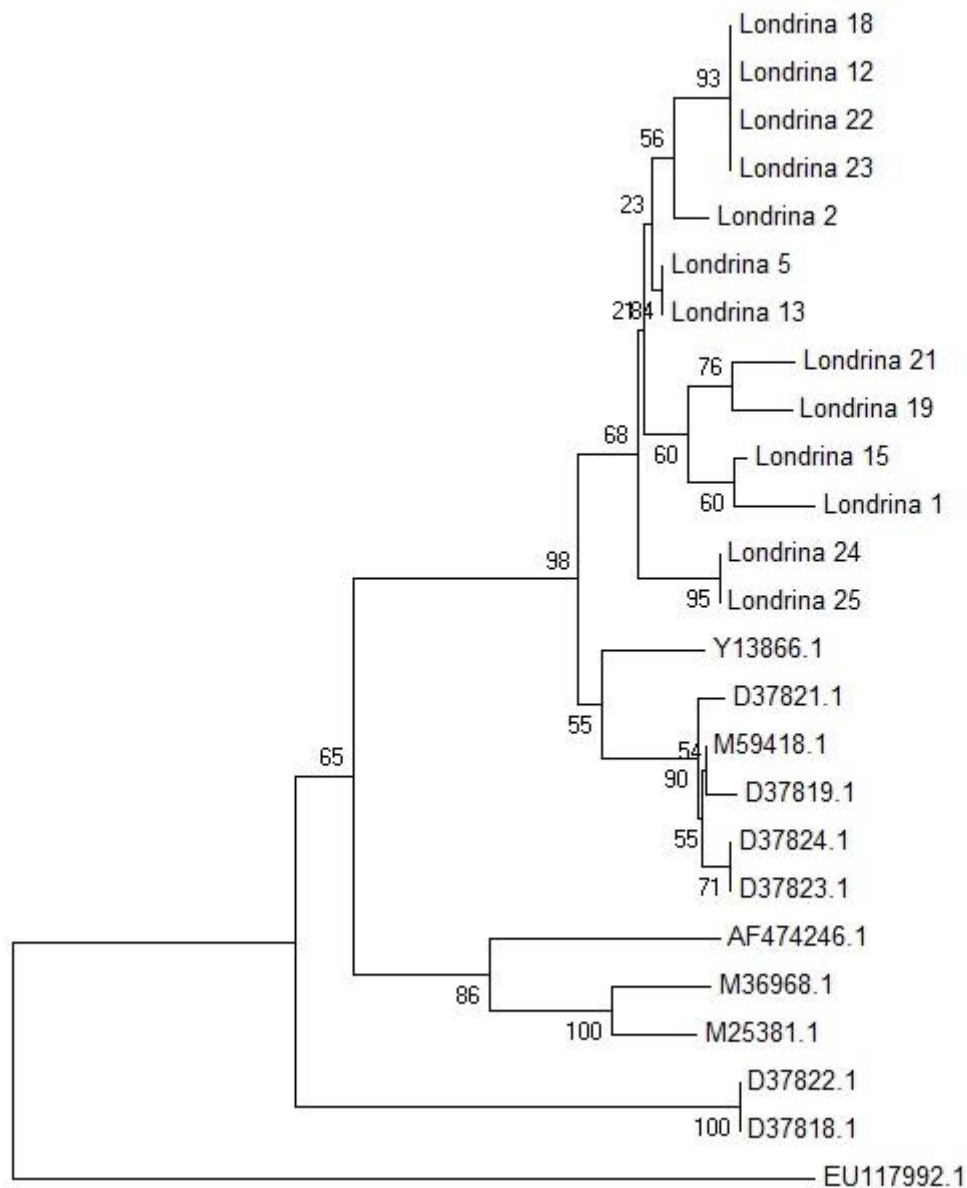


Figura 1 – Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining obtida através da análise de 13 sequências de nucleotídeos do gene *gag* do vírus da imunodeficiência felina do Paraná-Brasil. Números de acesso Genbank: Petaluma (M25381.1), Fukuoka (D37822.1), Aomori 1 (D37823.1), Sendai 2 (D37821.1), ItalyM3 (Y13866.1), TM2 (M59418.1), Yokohama (D37819.1), Aomori 2 (D37824.1), Shizuoka (D37818.1), San Diego (M36968.1), British Columbia (AF474246.1), 1027 (EU117992.1).

O subtipo B encontrado no presente trabalho, também foi descrito em estudos anteriores realizados no Brasil, o que caracteriza, até o presente momento, a ocorrência de um único subtipo do FIV no país (Caxito et al., 2006; Lara et al., 2007;

Martins et al., 2008; Silva et al., 2014). As amostras de Londrina, podem ser alocadas dentro de um subgrupo dentro do subtipo B, como indicado pelos valores de *bootstrap*. A existência de subgrupos dentro do subtipo B já havia sido descrita, inclusive no Brasil (Steinrigl e Klein, 2003., Caxito et al., 2006). Em Portugal, um estudo filogenético identificou apenas o subtipo B do FIV (Duarte et al., 2002). Entretanto, outro estudo com amostras de cidades de Portugal identificaram também a ocorrência do subtipo A e possivelmente um novo subtipo, designado subtipo F (Duarte e Tavares, 2006). Os resultados encontrados em Portugal ressaltam a importância dos trabalhos já realizados e da necessidade de estudos com maior número de amostras para se conhecer o real cenário da diversidade genética do FIV no Brasil.

As diferenças geográficas entre os subtipos do FIV foram demonstradas por trabalhos sobre a variabilidade genética realizados em vários países (Pecoraro, 1996, Steinrigl e Klein, 2003; Weaver et al., 2004; Duarte e Tavares, 2006). A variabilidade genética do FIV pode influenciar a resposta à vacina e dificultar o diagnóstico molecular (Steinrigl e Klein, 2003). Assim, a identificação dos subtipos (e possíveis subgrupos) é essencial numa determinada região antes da introdução de uma vacina. Embora este estudo represente apenas um passo inicial para o conhecimento da diversidade genética de isolados de FIV no Brasil, a identificação dos subtipos é um passo essencial para a produção de vacinas eficazes e para auxiliar no diagnóstico molecular com menor margem de resultados falso negativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDECCHI, P., MATTEUCCI, D., BALDINOTTI, F, et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* v.31, p.337-345, 1992.

BARLOUGH, J.E., ACKLEY, C.D., GEORGE, J.W., et al.. Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v. 4, p.219–227, 1991.

BĘCZKOWSKI, P.P., HUGHES, J., BIEK, R et al. Feline immunodeficiency virus (FIV) env recombinants are common in natural infections. *Retrovirology.*, v.11, p.80, 2014.

CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A. et al. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.20-25, 2000.

CAXITO, F.A.; COELHO, M.E.; RESENDE, M. Phylogenetic an analysis of feline immunodeficiency vírus strains from State of Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.1222-1225, 2006.

CRAWFORD, C. Progress on Diagnosis of Retroviral Infection. In: August J.R. *Feline Internal Medicine*. 6ed. St Louis: Saunders Elsevier, p.53-61, 2010.

DE ROZIERES, S.; THOMPSON, J. Replication properties of clade A/C chimeric feline immunodeficiency viruses and evaluation of infection kinetics in the domestic cat. *J. Virol.*, v.82, p.7953-7963, 2008.

DUARTE A., MARQUES M.I., TAVARES L., et al. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. *Arch. Virol.* v.147, p.1061-1070, 2002.

DUARTE A., TAVARES L. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.*, v. 114, p.25-33, 2006.

HAGIWARA, M.K.; RECHE JUNIOR, A.; DAGLI, M.L.Z. Feline immunodeficiency virus infection in cats from Sao Paulo, Brazil. *Braz. Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.30, p.217-220, 1993.

HAYWARD, J. J; J. TAYLOR; A. G. RODRIGO. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *J. Virol.* V.81, p.2999–3004,2007.

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M. et al. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analyses of the gag gene. *J. Virol. Methods*, v.70, p.107-111, 1998.

ISHIDA, T., T; WASHIZU, K; TORIYABE, S et al.,Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan.*J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.194, p´.221–225, 989.

KAKINUMA, S., K. MOTOKAWA, T. HOHDATSU, J. K ET AL.,. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus:classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct fromnon-Japanese subtypes. *J. Virol.* 69:3639–3646, 1995.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.*, v. 5, p.150-163, 2004.

LARA, M.V.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO Jr., J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.467-470, 2007.

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAUJO JUNIOR, J.P. Occurrence of feline immunodeficiency virusinfection in cats. *Cienc. Rura.*, v. 38,p. 2245-2249, 2008.

MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P. et al. Phylogenetic and genetic analyses of feline immunodeficiency virus gag, pol and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Virol.*, v.82, p.7863-7874, 2008.

MARÇOLA, T.G., GOMES, C.P.C, SILVA. P.A., et al. Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. *Virus Genes.*, v.46, p.546–550, 2013.

NAKAMURA, K., SUZUKI, Y., IKEO, K., et al. Phylogenetic analysis of Vietnamese isolates of feline immunodeficiency virus: genetic diversity of subtype C. *Arch. Virol.*, v. 148, p.783–791, 2003.

PECORARO, M.R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T. et al. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.2031-2035, 1996.

PEDERSEN N.C., HO E.W., BROWN M.L., et al. Isolation of a Tlymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science.*, v. 235, p.790-793, 1987.

PEDERSEN N.C, TORTEN M., RIDEOUT B., et al. Feline leukemia virus infection as a potentiating co-factor for the primary stage of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *Anais Quatrième Colloque des Cent Gardes, Paris.*, p. 167-171, 1989.

PEDERSEN, N.C.; LEUTENEGGER, C.M.; WOO, J., et al. Virulence differences between two field isolates of feline immunodeficiency virus (FIV-APetaluma and FIV-CPGammar) in young adult specific pathogen free cats. *Vet. Immunol. Immunop.*, v.79, p.53-67, 2001.

POSADA, D., CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Appl.*, v. 14, p.817-818, 1998.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, v. 6, p.406-425, 1987.

SELLON, R.K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: Greene C.E. *Infectious Diseases of The Dog and The Cat*. 4ed. United States: Elsevier, p.136-149, 2012.

SODORA D.L., SHAPER E.G., KITCHELL B.E., et al. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *J. Virol.*, v. 68, p.2230-2238, 1994.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Epidemiological study of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in domestic cats in the city of Rio de Janeiro. *Clín.Vet.*, v. 36, p.14-21, 2002.

STEINRIGL A., KLEIN D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *J. Gen. Virol.*, v. 84, p.1301-1307, 2003.

STEINRIGL, A., ERTL, R., LANGBEIN, I., et al. Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, v. 134, p. 82–89, 2010.

TAMURA, K., NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.*, v.10, p.512-526, 1993.

TEIXEIRA, B.M.; RAJÃO, D.S.; HADDAD, J.P.A., et al. Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in Sheltered domestic cats of Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.59, p. 939-942, 2007.

TEIXEIRA, B.M., RECHE Jr., A. HAGIWARA, M.K. Vírus da imunodeficiência felina – uma atualização. *Clin.Vet.*, v.88, p.54-66, 2010b.

TEIXEIRA, B.M., LOGAN, N, CRUZ, J.C.M., et al. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol.*, v.155, p.379–384, 2010.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., ET AL. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p.4876-4882, 1997.

**CAPÍTULO 3 – INSULINOMA
CANINO – RELATOS DE CASOS**

INSULINOMA CANINO – RELATOS DE CASOS CANINE INSULINOMA – CASE REPORTS

Luisa PADOVANI^{1*}; Diego Dare da SILVA²; Jéssica Regina MOREIRA³; Mauro José Lahm CARDOSO⁴; Giovana Wingeter DI SANTIS⁵; Marcelo de Souza ZANUTTO⁴.

^{1*}Pós-graduanda *stricto sensu* Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), luisapadovani1@hotmail.com.

²Pós-graduando *lato sensu* Setor de Clínica Médica de Animais de Companhia, Hospital Veterinário (HV), Universidade Estadual de Londrina (UEL).

³Residente em Medicina Veterinária na área de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, HV-UEL.

⁴Departamento de Clínicas Veterinárias, Setor de Clínica Médica de Animais de Companhia, HV-UEL.

⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Patologia Animal, HV-UEL.

RESUMO

O insulinoma é um tumor das células β do pâncreas, que têm a função de produzir e secretar insulina e, geralmente são malignos em cães. O presente trabalho descreve o diagnóstico e o manejo terapêutico de três casos de insulinoma. Os sinais clínicos dos animais relatados variaram de acordo com a severidade e a duração da hipoglicemia. O diagnóstico presuntivo se deu através dos sinais clínicos e da dosagem de insulina sérica no momento de mais intensa hipoglicemia e, o diagnóstico definitivo foi obtido por meio de exame histopatológico nos três casos relatados. O tratamento realizado variou de acordo com a intensidade dos sinais clínicos.

Palavras – chave: Tumor, células β , hipoglicemia.

ABSTRACT

Insulinoma is a tumor of the β cells of the pancreas, which have the function to produce and secrete insulin and are usually malignant in dogs. This paper describes the diagnosis and therapeutic management of three cases of insulinoma. The clinical signs reported animals varied according to the severity and duration of hypoglycemia. The presumptive diagnosis was based on clinical signs and serum insulin dosage at the time of hypoglycemia and more intense, the definitive diagnosis was made by histopathological examination in three of the reported cases. The treatment was varied according to the severity of clinical signs.

Keywords: tumor, β cells, hypoglycemia.

INTRODUÇÃO

Os insulinomas, também conhecido como tumores de células β secretoras de insulina ou carcinomas de células β , são tumores funcionais de células β do pâncreas que secretam insulina independente dos efeitos supressores da hipoglicemia e são os tumores pancreáticos endócrinos mais comuns descrito em cães (Goutal et al., 2012).

Embora outros hormônios sejam produzidos, a insulina é prevalente e é devido ao excesso de sua produção que surgem os sinais clínicos que resultam de neuroglicopenia induzida pela hiperinsulinemia e incluem letargia, fraqueza, ataxia, mudanças de comportamento, convulsões, coma e morte. As alterações decorrentes do aumento nas concentrações de hormônios antagonistas da insulina (ex. glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio de crescimento) incluem fasciculações, tremores musculares, alterações de comportamento e inquietação (Leifer et al., 1986; Hess, 2005; Goutal et al., 2012).

O diagnóstico presuntivo de insulinoma inclui a combinação dos sinais clínicos, exames laboratoriais e de imagem (Goutal et al., 2012; Nelson, 2015). O achado laboratorial mais consistente nesses pacientes é a hipoglicemia, que na maioria dos casos está abaixo de 70mg/dL (normal: 70mg/dL-110mg/dL), e a elevação dos níveis séricos de insulina (Goutal et al., 2012; Fossum e Caplan, 2015). Os exames de imagem, particularmente o ultrassom, auxiliam o cirurgião pelas informações quanto à localização, tamanho, quantidade de tumores no pâncreas e presença de metástases (Meleo, 1990; Goutal et al., 2012). O diagnóstico definitivo de insulinoma se dá através do exame citológico e histopatológico (Nelson, 2015).

O tratamento de pacientes com insulinoma pode ser cirúrgico e/ou médico dependendo do caso (Fossum e Caplan, 2015). O prognóstico da doença varia de reservado a ruim e é influenciado pela presença de metástase, da quantidade e do tamanho dos tumores e da facilidade ou não de remoção da massa no momento do diagnóstico (Goutal et al., 2012).

O presente trabalho tem como objetivo além de descrever os sinais clínicos, diagnóstico e a abordagem terapêutica de três casos de insulinoma atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina no período de abril de

2013 a junho de 2015, contribuir sobre o alerta para os clínicos, da suspeita diagnóstica, uma vez que a sintomatologia apresentada pelo animal é inespecífica e pode ser confundida com outras doenças.

RELATO DE CASOS

CASO 1

Uma fêmea canina, sem raça definida, dez anos, 18 quilos, foi atendida com queixa de ataxia, êmese e um episódio convulsivo. Exame físico sem alterações. Os exames laboratoriais revelaram hipoglicemia (50 mg/dL). Durante o internamento o animal apresentou quatro episódios convulsivos. Realizou-se aplicação de diazepam e bolus lento de glicose IV, pois a glicemia durante os episódios estava entre 29 e 38 mg/dL. No mesmo momento, com o animal em jejum, foram obtidas amostra de soro para dosagem de insulina por radioimunoensaio (B.E.T. Laboratories-RJ) que revelou concentração de 13,7 $\mu\text{U/mL}$ (normal: 5-25 $\mu\text{U/mL}$) e de sangue para dosagem de glicose que estava 30mg/dL. Iniciou-se terapia com glicocorticoide (dexametasona) durante seis horas e, após o animal foi submetido à celiotomia exploratória diante da suspeita de insulinoma. Por meio da cirurgia visualizou-se nódulo em pâncreas (Figura 1A, B e C), que foi retirado e encaminhado para análise citológica e histopatológica. À citologia havia predomínio de células epiteliais, ora em agregados coesos, ora dispersas, com moderada relação núcleo:citoplasma, núcleos redondos, nucléolos inconspícuos a pequenos e únicos, citoplasma levemente basofílico, finamente vacuolizado e granular e baixo pleomorfismo celular e nuclear, não permitindo a diferenciação entre adenoma e carcinoma. Ao exame histopatológico observou-se nódulo parcialmente infiltrativo inserido no parênquima pancreático, caracterizado por ninhos e trabéculas de células epiteliais envoltos por tecido fibrovascular delicado, permeando o tecido pancreático normal e a musculatura lisa duodenal. As células apresentavam pleomorfismo discreto, citoplasma eosinofílico, granular, finamente vacuolizado, núcleos redondos e nucléolos pequenos e únicos com áreas eventuais de pleomorfismo nuclear moderado (Figura 2A, B). A paciente veio a óbito ao final do procedimento cirúrgico decorrente de complicações anestésicas. Não se encontrou evidência de metástases à necropsia e ao exame histopatológico. A proprietária não permitiu a abertura do crânio para remoção e avaliação encefálica.

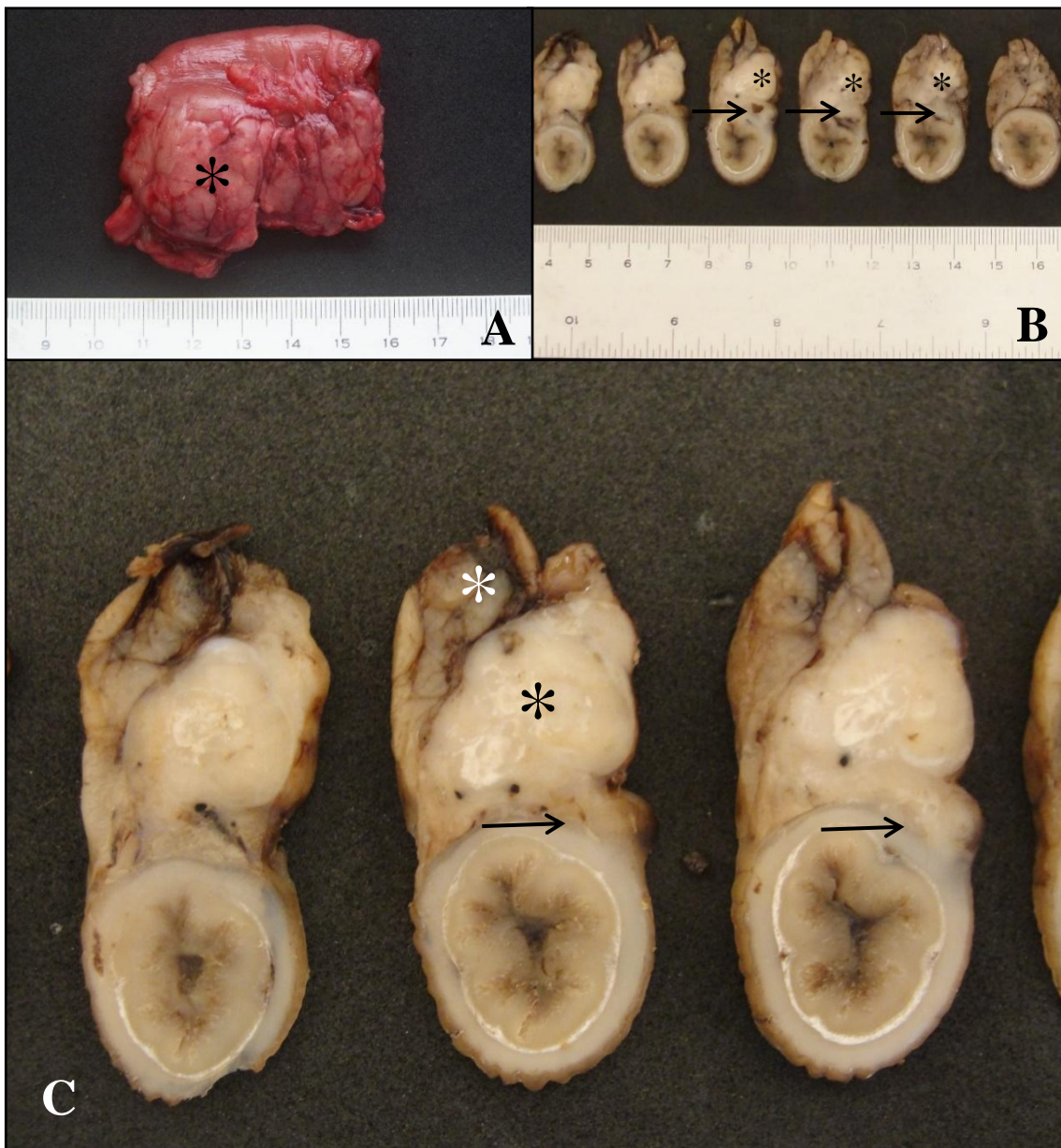


FIGURA 1: A) Fragmento de pâncreas e duodeno, com nódulo pancreático (*) após ressecção cirúrgica. B) Cortes transversais seriados de duodeno com infiltração neoplásica em serosa e muscular (seta) a partir de nódulo pancreático (*). C) Visão aproximada dos três primeiros segmentos observados em “B” com destaque para as áreas de infiltração neoplásica na parede do duodeno (setas) oriunda do nódulo pancreático (asterisco preto) e sua relação com o pâncreas normal (asterisco branco).

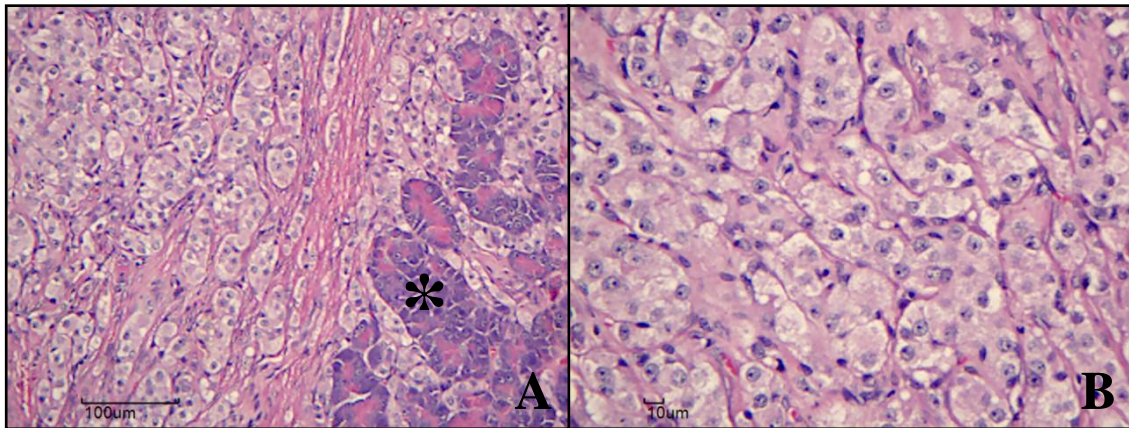


FIGURA 2: Cão, pâncreas, carcinoma de células β . A) Pâncreas. Ninhos e trabéculas de células epiteliais com citoplasma vacuolizado, eosinofílico permeando ácinos exócrinos (*). HE, 200X. B) Neoformação pancreática. Ninhos e trabéculas bem delimitados por tecido fibrovascular delicado, compostos por células epiteliais com pleomorfismo celular e nuclear discretos, núcleos redondos com nucléolos geralmente presentes, únicos e pequenos (setas). HE, 400X.

CASO 2

Um canino, fêmea, da raça boxer, 16 anos, 18 quilos, não castrada foi atendida com queixa de ataxia, agitação e um episódio convulsivo. Ao exame físico o animal apresentava nódulos em mamas e demais parâmetros sem alterações. Os exames laboratoriais revelaram apenas hipoglicemia (30 mg/dL). No atendimento o animal apresentou convulsões focais e movimentos de pedalagem que não cessaram com a administração de diazepam e fenobarbital. Mesmo com o início do fenobarbital, administração em bolus lento de glicose e glicocorticoide (dexametasona), o paciente apresentou mais três convulsões que cessaram apenas com administração de propofol. Durante os episódios a glicemia estava entre 27 e 34 mg/dL. No momento da menor glicemia, foi obtida amostra de soro, com o animal em jejum, para dosagem de insulina por radioimunoensaio (B.E.T. Laboratories-RJ) que revelou concentração de 3,7 μ U/ml. No segundo dia de hospitalização o animal veio a óbito e foi realizada necropsia que identificou nódulo de 1cm de diâmetro na cabeça do pâncreas (Figura 3A), além de neoformações em pulmão, miocárdio, pele e um nódulo mamário. Microscopicamente, o nódulo pancreático era bem delimitado, parcialmente infiltrativo no tecido adjacente, composto por trabéculas e ninhos celulares delimitados por estroma fibrovascular delicado (Figura 3B). As células

apresentavam citoplasma eosinofílico, levemente granular, núcleos redondos, pequenos e nucléolos inconspícuos (Figura 3C). O linfonodo peripancreático estava livre de metástases. As neofomações em miocárdio e pulmão eram metástases do carcinoma mamário.

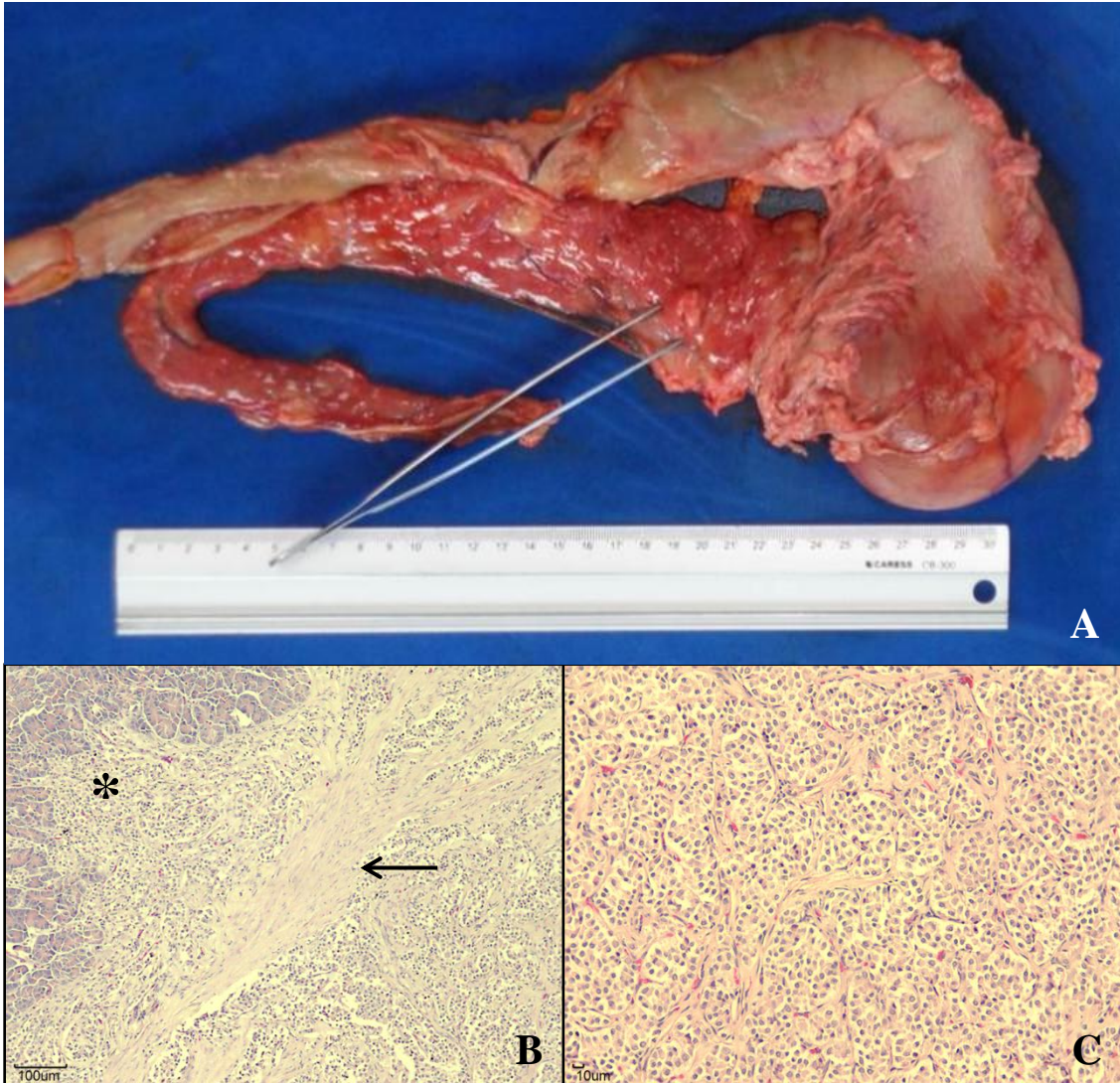


Figura 3: Cão, pâncreas, carcinoma de células β . A) Discreta neofomação circular, esbranquiçada,protruindo do parênquima pancreático. B) Observa-se neofomação infiltrando o estroma pancreático (*) a partir de uma capsula fibrosa que delimita parcialmente o tumor (seta). HE, 100x. C) Neofomação caracterizada por ninhos de células epiteliais com citoplasma eosinofílico e núcleos redondos, delimitados por septos fibrovasculares. HE, 200x.

CASO 3

Um canino, fêmea, da raça cocker americano, 13 anos, 14,3 quilos, castrada foi atendida com queixa de convulsões e fraqueza intermitentes com evolução de 2 meses. Ao exame físico o animal apresentava nódulos mamários e demais parâmetros normais. Os exames laboratoriais revelaram apenas hipoglicemia (25 mg/dL). O animal foi internado para monitoração e foi coletado sangue, com animal em jejum, simultaneamente para dosagem sérica de insulina por radioimunoensaio (B.E.T.Laboratories-RJ) e de glicose que revelaram concentração de 36 μ U/ml e 28mg/dL respectivamente. Ao exame ultrassonográfico não foram detectadas alterações. Foi iniciado o tratamento médico com glicocorticóide diante da suspeita de insulinoma (prednisona – na dose inicial de 0,5 mg/kg via oral) três vezes ao dia. Durante o tratamento o animal foi submetido à mastectomia unilateral direita. A dose do corticóide foi reduzida gradualmente até 0,17mg/kg de prednisona uma vez ao dia e, o animal se manteve sem sinais clínicos em decorrência da hipoglicemia até junho de 2015, um ano e seis meses após o diagnóstico presuntivo de insulinoma, quando retornou ao HV-UEL com queixa de convulsão. Durante o internamento mesmo com o tratamento instituído as convulsões não cessaram e o proprietário optou pela eutanásia. O animal foi submetido à necropsia onde foi visualizado tumor único, firme e irregular em pâncreas, tumores em mamas e nódulos em fígado e pulmões. Histologicamente observou-se neoformação em pâncreas, parcialmente encapsulada, caracterizada por ninhos de células epiteliais moderadamente dispersas, delimitados por estroma fibrovascular moderado (Figura 4A). As células apresentavam citoplasma eosinofílico, finamente granular, núcleos redondos e nucléolos inconspícuos. O linfonodo peripancreático apresentava infiltração neoplásica acentuada (Figura 4B), assim como o fígado. As neoformações pulmonares eram metástases de carcinoma mamário. O encéfalo apresentava edema perivascular e perineuronal moderados, além de vacuolização moderada do neurópilo.

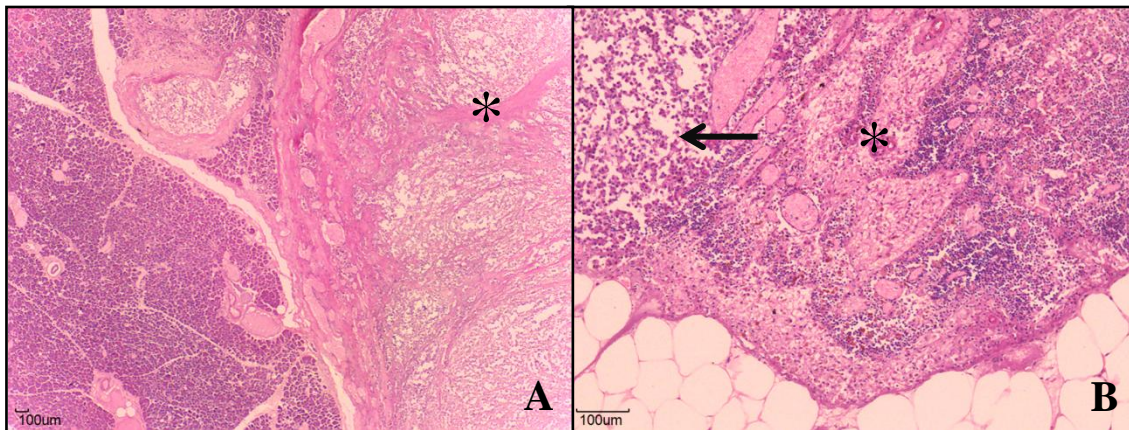


Figura 4: Cão, pâncreas, carcinoma de células β . A) Neoformação pancreática (*) delimitada e septada por tecido fibrovascular espesso produzindo um aspecto lobulado no menor aumento. HE, 25x. B) Linfonodo peripancreático (*) parcialmente substituído pelo tecido neoplásico (seta). HE, 100x.

DISCUSSÃO

As pacientes, diagnosticadas com insulinoma, apresentavam porte médio a grande e idade acima de nove anos. A idade média de apresentação da doença está entre 8,5 e 10 anos de idade (Ellie e Zerbe, 1996; Nelson, 2015). Os cães de raças médias a grandes são mais acometidos, com peso corporal médio acima de 25 quilos (Steiner e Bruyette, 1996; Nelson, 2015).

O exame físico raramente apresenta alterações significativas, a menos que esses pacientes apresentem sinais devido às obstruções pelo tumor primário ou às metástases (Goutal et al., 2012). As pacientes apresentavam como principal sinal clínico episódios convulsivos e ao exame físico não foram notadas alterações relacionadas diretamente ao insulinoma. Clinicamente, é importante associar a presença de hipoglicemia com a elevação dos níveis séricos de insulina e a presença de neoplasia de células β (Goutal et al., 2012; Nelson, 2015). A hipoglicemia frequente, verificada durante o internamento, é o achado laboratorial mais comum nesses pacientes (Goutal et al., 2012). Os sinais clínicos, descritos anteriormente, nos casos de insulinoma, são decorrentes da hipoglicemia induzida pela hiperinsulinemia, porém mesmo com a queda nos valores da glicemia alguns animais com insulinoma não apresentam sinais clínicos, pois eles se adaptam a

hipoglicemia crônica durante determinado período de tempo (Leifer et al.,1986; Goutal et al., 2012).

O soro foi coletado, em jejum, após verificação de hipoglicemia intensa e sustentada para a mensuração da insulina. O resultado da concentração de insulina sérica variou entre os casos relatados. Quando a concentração de insulina sérica está acima de 20 $\mu\text{U/mL}$ ($5\mu\text{U/mL}$ - $25\mu\text{U/mL}$) interpreta-se como alta a probabilidade do insulinoma, quando está entre 10-20 $\mu\text{U/mL}$ há possibilidade de ser tumor de células β , entre 5-10 $\mu\text{U/mL}$ há pouca chance de confirmar o diagnóstico e abaixo de $5\mu\text{U/mL}$ é descartada a suspeita de insulinoma (Nelson, 2015), porém no caso 2 relatado a concentração de insulina sérica estava abaixo de $5\mu\text{U/mL}$ e o exame histopatológico confirmou o tumor de pâncreas. A concentração da insulina do caso 2 foi incompatível com a suspeita clínica de insulinoma, o que pode ser explicado pelo aumento do fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1), que é produzido em resposta ao hormônio de crescimento (GH) e, que também reduz a glicemia (Buishand et al., 2012). Em pacientes hígidos, os níveis de insulina sérica devem estar abaixo do normal ou indetectáveis ($<5 \mu\text{U/mL}$) quando a glicose sanguínea for inferior a 60 mg/dL (Goutal et al., 2012). O diagnóstico presuntivo pôde assim ser estabelecido pela demonstração de aumento nos níveis de insulina inapropriados associados à hipoglicemia nos dois outros casos relatados.

O exame ultrassonográfico pode ser utilizado para detectar presença de massa em pâncreas em muitos casos, além de detectar presença de metástase (Nelson, 2015). Nos dois primeiros casos, diante da gravidade do quadro, não houve tempo hábil para o encaminhamento do exame.

Clinicamente o termo insulinoma se refere a tumores de células β , independente da sua malignidade. Histologicamente, o insulinoma pode ser classificado como adenoma ou carcinoma de células β , considerando os critérios que determinem sua malignidade (Capen, 2002).

A escolha do tratamento, médico e/ou cirúrgico, foi determinado de acordo com a gravidade dos sinais clínicos, opção dos proprietários e exames de imagem (Tobin et al., 1999). A paciente do primeiro relato possuía um nódulo único no pâncreas que foi retirado completamente durante a cirurgia. Caso ela sobrevivesse haveria chance de cura e melhor prognóstico (Fossum e Caplan, 2015). O tratamento médico com dextrose por via intravenosa deve ser iniciado durante as crises de hipoglicemia. Como os tumores de células β , embora secretem insulina independente dos efeitos

supressores da hipoglicemia, não são completamente autônomos, e respondem a estímulos (e.x., glicose) com a secreção de insulina em quantidades excessivas, a administração de dextrose deve ser lenta e cautelosa. Após a estabilização dos sinais clínicos mantém-se fluidoterapia com dextrose 5% (Leifer et al., 1986; Meleo, 1990; Goutal et al., 2012). Os glicocorticóides também podem ser usados, pois antagonizam os efeitos da insulina por sua ação hiperglicemiante. Para o tratamento dos sinais crônicos associados ao insulinoma são utilizados medicamentos como prednisona, diazóxido e octreotida (Goutal et al., 2012; Nelson, 2015). Os tumores de células β geralmente são malignos e os locais mais comuns de metástase são o fígado e linfonodos (Goutal et al., 2012). A paciente do segundo caso apresentava metástase em linfonodo regional e fígado, porém as metástases pulmonares nos casos 2 e 3 eram ambas de carcinomas mamários.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O insulinoma é um tumor de pâncreas endócrino, geralmente maligno. Embora não tenham estudos que revelem a prevalência da doença em cães, sabe-se que a taxa de mortalidade é alta e que a intervenção médica e/ou cirúrgica deve ser o mais rápida possível a partir do diagnóstico da doença. Diante do quadro clínico característico, mesmo que a concentração de insulina sérica não esteja alta no momento da constatação da hipoglicemia, não se deve descartar a possibilidade de insulinoma, e o exame histopatológico deve ser realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUISHAND, F.O.; VAN ERP, M.G.M.; GROENVELD, H.A. et al. Expression of insulin-like growth factor – 1 by canine insulinomas and their metastases. *Vet J.*, v.191, p.334-340, 2012.

CAPEN, C.C. Tumors of the endocrine glands. In: MEUTEN, D.J.(Ed.). *Tumors in Domestic Animals*. 4.ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 607-664.

CAYWOOD, D.D.; KLAUSNER, J.S.; O'LEARY, T.P. et al. Pancreatic insulin-secreting neoplasms: clinical, diagnostic and prognostic features in 73 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.*, v.24, p.577-584, 1988.

ELLIE, M.S., ZERBE, C.A. Insulinoma in dogs, cats and ferrets. *Compend Contin Educ Vet.*,v.18, n.1,p.13-25, 1996.

FOSSUM, T.W.; CAPLAN, E.R. Surgery of the pancreas. In: FOSSUM T.W. Small animal surgery. 4.ed. St Louis (MO): Mosby Elsevier, 2015. p. 660-664.

GOUTAL, C.M.; BRUGMANN, B.L.; RYAN, K.A. Insulinoma in dogs: A review. *Anim Hosp Assoc.*,v.48, p.151-163, 2012.

HESS, R.S. Insulin secreting islet cell neoplasia. In: ETTINGER S.J, FELDMAN E.C, eds. Textbook of veterinary internal medicine. 6.ed. Philadelphia (PA): Saunders Elsevier, 2005. p.1560-1563.

LEIFER, C.E.; PETERSON, M.E.; MATUS, R.E. Insulin-secreting tumor: diagnosis and medical and surgical management in 55 dogs. *J Am Vet Med Assoc.*, v.188, n.1, p.60-64, 1986.

MELEO, K. Management of insulinoma patients with refractory hypoglycemia. *Probl Vet Med.*, v.2, n.4, p. 602 –609, 1990.

NELSON, R.W. Beta cell neoplasia: insulinoma. In: FELDMAN E.C, NELSON R.W, Reuscha, C.E; Scott-Moncrieff, J.C.R; Behrend, E.N eds. Canine and feline endocrinology. 4.ed. St Louis (MO): Saunders Elsevier, 2015. p. 348-375.

STEINER, J.M.; BRUYETTE, D.S. Canine insulinoma. *Compend Contin Educ Vet.*, v. 18, n.1, p. 13–25, 1996.

TOBIN, R.L.; NELSON, R.W.; LUCROY, M.D. et al. Outcome of surgical versus medical treatment of dogs with beta cell neoplasia: 39 cases (1990-1997). *J Am Med Vet Assoc.*, v. 215, n.2, p. 226-230, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA CONVITE PARA ESCREVER O CAPÍTULO DE LIVRO

Prezado Dr. Marcelo Zanutto

É com muita alegria que informamos que estamos pretendendo escrever o Livro “DOENÇAS INFECCIOSAS DE FELINOS”, no qual gostaríamos de lhe convidar para nos prestigiar escrevendo sobre uma ou mais doenças (tema). A ideia é abordar o maior número de temas possíveis e atuais de interesse para a saúde animal ou com potencial zoonótico que acometa os felinos domésticos. Para tanto, estamos dando oportunidade aos colegas para que eles escolham os temas que mais tiverem afinidade. Em caso de mais de um autor escolher o mesmo assunto, estaremos entrando em contato, para intermediarmos a solução do impasse.

Este livro tem por objetivo subsidiar e preencher uma grande lacuna sentida pelos clínicos veterinários de “pet’s felinos”, professores e acadêmicos do curso de medicina veterinária.

O coordenador do capítulo (tema), como passará a ser chamado o colega que aceitar nosso convite, poderá convidar até dois colaboradores para ajudar na elaboração do(s) tema(s) escolhido. Gostaríamos de informar que cada participante, incluindo o coordenador, receberá um exemplar do livro como cortesia.

Informo que a ideia é nova, mas a necessidade é antiga, pois acreditamos que existe hoje na nossa profissão uma necessidade permanente de atualização e aquisição de novos conhecimentos científicos. Portanto, você foi selecionado entre muitos profissionais que se destacam na área para alavancar a sua capacidade de formador de opinião e disseminador da ciência veterinária.

Até este momento, não escolhemos a Editora ou Livraria que ficará responsável pela comercialização desta obra, pois estamos em negociação com algumas que demonstraram interesse em nos apoiar, mas não descartamos a possibilidade de uma produção independente ou com apoio de empresas privadas que tenham interesse em subsidiar a produção. Esta negociação tem o intuito de tornar a obra final com custo mais acessível possível para o maior número de colegas do Brasil e exterior.

A intenção inicial é que no menor prazo possível tenhamos o livro “DOENÇAS INFECCIOSAS DE FELINOS” à disposição da comunidade médica veterinária, portanto, se você está pensando em aceitar nosso convite, verifique sua disponibilidade de agenda e interesse em participar. Para tanto, podemos antecipar que o prazo para entrega da primeira versão do capítulo que estará sob sua responsabilidade será 01.11.2015. Assim, solicitamos antecipadamente a gentileza de respeitarem os prazos que serão definidos e negociados com os coordenadores de capítulos para entrega das versões e correções.

Neste momento, aguardo somente a confirmação do aceite em participar da elaboração do livro, para encaminharmos as orientações necessárias para elaboração de cada capítulo, o cronograma de trabalho e tirarmos as dúvidas necessárias.

Para finalizar, gostaríamos de informar que a previsão inicial de entrega para Editoração será no final do primeiro semestre de 2017.

Agradecemos deste já a sua participação.
Cordialmente,

Prof. Dr. Francisco Anilton Alves Araújo
Profa. Ms. Giovana Mazzotti

ANEXO B – PROTOCOLO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 88/2016

Londrina, 09 de Maio de 2016.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado "**Ocorrência dos subtipos do vírus da imunodeficiência felina no Hospital Veterinário da UEL**", protocolo CEUA nº **3760.2016.82**, sob a responsabilidade de **Marcelo de Souza Zanutto**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **03/05/2016**.

O objetivo do projeto é realizar a caracterização molecular do vírus da imunodeficiência felina, para o conhecimento de qual subtipo do vírus é predominante em Londrina PR. O estudo será realizado nos gatos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF) atendidos durante a rotina do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UDEL), no ano de 2016. Para o desenvolvimento do trabalho serão analisados os prontuários que contêm os resultados dos testes rápidos para retrovírus realizados nos gatos atendidos. Os animais que tiveram o resultado positivo no teste rápido para o VIF serão acompanhados, e com o consentimento do proprietário, será utilizado o resto de sangue total, aproximadamente 1 ml, que foi colhido como parte da avaliação laboratorial de rotina da evolução da infecção e direcionado para o Laboratório de Análises Clínicas do HV-UDEL. A alíquota de sangue encaminhada para hemograma será acondicionada em tubos com EDTA. O volume de sangue que sobrar será encaminhado para o Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biociências da UNESP, localizada na cidade de Botucatu-SP, onde será confirmada a infecção pelo VIF pela nested-PCR ao pró-vírus e em seguida realizado o sequenciamento genético do vírus para a caracterização molecular e obtenção do subtipo viral. GI 1.

Vigência do Projeto	01/05/2016 a 01/05/2017
Espécie/linhagem	Gato / Variada
Nº de animais	Indefinido
Peso/Idade	Variados
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Hospital Veterinário / UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

Coordenador do Projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias / Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Diretor(a) do Hospital Veterinário, Chefe do Departamento de Clínicas Veterinárias e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias

ANEXO C – CARTA DE ACEITE DA REVISTA ABMVZ

19-Jan-2017

Caro Dra. PADOVANI:

É um prazer aceitar seu manuscrito intitulado "CANINO Insulinoma - RELATO DOS CASOS" em sua forma atual para publicação no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Os comentários do revisor (s) que revisou seu manuscrito estão incluídas no pé desta carta.

Obrigado pela sua contribuição bem. Em nome dos editores do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, estamos ansiosos para suas contribuições contínuas para o Journal.

Atenciosamente,

Dr. Antonio de Pinho Marques Jr

Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

ampinho.editor@gmail.com

Editor Associado

Comentário para o autor:

(Não há comentários.)