



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**Estandarización de la técnica de hibridación *in situ* en preparados
citológicos de cavidad oral de felinos domésticos infectados con el Virus
de la Leucemia Felina (FeLV)**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Jorge Alejandro Baltazar Marcué

Asesor: M. en C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez

Co-asesor: PhD Lucia Angélica García Camacho

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTOS VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Estandarización de la técnica de hibridación in situ en preparados citológicos de cavidad oral de felinos domésticos infectados con el Virus de la Leucemia Felina (FeLV)

Que presenta el pasante: **JORGE ALEJANDRO BALTAZAR MARCUÉ**

Con número de cuenta: **30801320-3** para obtener el Título de la carrera: **Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de diciembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	M. en C. Ignacio Carlos Rangel Rodríguez	
1er. SUPLENTE	M. en D. Olivia Adams Vázquez	
2do. SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

Agradecimientos

Quiero agradecer con todo mi corazón a mi familia, en especial a mi madre Alejandra, que sin ella jamás habría llegado tan lejos, quien día y noche me apoyo desde pequeño para alcanzar mis metas y sueños. A mis primos Luis y Adolfo a quienes amo y quiero que ellos cumplan metas mucho más grandes, solo es cuestión de ser persistente.

Al doctor Ignacio y a la doctora Lucía quienes me dieron la oportunidad de trabajar en su proyecto.

A todos mis amigos quienes me ayudaron mucho y siempre estuvieron a mi lado. Eduardo, Nayelli, Alejandro y Erik. A Nuria por siempre apoyarme.

Gracias a todo el personal del hospital de pequeñas especies que apporto su conocimiento y entusiasmo por los gatos.

Al equipo de trabajo del laboratorio A de patología molecular, Ernesto, Alejandro, Michel y Alhelí que me enseñaron mucho, guiaron y me brindaron su amistad durante mi estancia.

A los doctores Eduardo y Ana por su apoyo y ejemplo, por brindarme su confianza y la oportunidad de trabajar con sus pacientes.

A todos los propietarios de los gatos evaluados que me confiaron algo tan valioso.

Contenido

Índice de tablas y figuras.....	5
Resumen	6
Introducción	7
Etiología	8
Patogenia	9
Oncogénesis	13
Respuesta inmune	15
Factores de riesgo	17
Signos clínicos	17
Diagnóstico	19
Tratamiento	19
Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	20
PCR	23
Objetivos	23
Materiales y métodos	24
Población de estudio	24
PCR	25
Extracción del ADN:.....	27
Mezcla para PCR.....	28
Amplificación.....	28
Visualización de los productos.....	28
Hibridación <i>In Situ</i> (HIS)	29
Soluciones de lavado:.....	29
Solución de hibridación.....	30
Solución de cromógeno	31
PCR DIG:	31
Citología:.....	32
Resultados	32
Discusión	37
Conclusiones	39
Referencias	39

Índice de tablas y figuras

Figura 1: Diagrama del genoma del FeLV.....	8
Figura 2: Esquema estructural del FeLV.....	8
Cuadro 1. Infección abortiva por el FeLV	10
Cuadro 2. Infección regresiva de la infección por el FeLV.....	11
Cuadro 3. Infección progresiva de la infección por el FeLV.....	12
Tabla 1. Fases de la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV).....	13
Figura 3. Concepto de la inserción retroviral al genoma celular.....	15
Figura 4. Esquema de preparación de la sonda mediante PCR.....	20
Tabla 2. Alineamiento de secuencias de un fragmento del gen env del FeLV con secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR.....	26-27
Figura 5. Citologías de mucosa oral en felinos domésticos aparentemente sanos.....	34
Figura 6. Geles de agarosa mostrando los resultados obtenidos en la PCR de env del FeLV.....	35
Figura 7. Tubo de microcentrifuga con reacción positiva DIG-anti-DIG.....	36
Figura 8. HIS específica para el FeLV en preparados citológicos de mucosa oral de felinos domésticos.....	36
Figura 9. Gel de electroforesis de curvas de PCR para env FeLV.....	37

Resumen

Se obtuvieron muestras de sangre y se realizaron preparados citológicos de mucosa oral de 123 felinos domésticos apoyado por el Hospital de Enseñanza en Medicina y Cirugía Pequeñas Especies de la FES-C y en clínicas veterinarias en el Estado de México y CDMX para el diseño y estandarización de la hibridación *in situ* para la detección de ADN proviral, se estandarizó previamente un ensayo de PCR para la detección del gen env FeLV en ADN genómico obtenido de sangre y mucosa oral felina, el cual puede detectar concentraciones de ADN de hasta 4 ng/μl. La estandarización de la hibridación *in situ* no tuvo éxito, debido a las condiciones de hidratación constante y el uso de enzimas y detergentes, favoreció el desprendimiento de las muestras, las cuales contenían muy poco material genético para demostrar la presencia topológica del provirus en las células de mucosa oral. Para demostrar la presencia del virus en los preparados citológicos se decidió extraer ADN genómico resuspendiendo las células en PBS y demostrando el ADN proviral mediante PCR.

Introducción

El virus de leucemia felina (FeLV) pertenece a la familia *Retroviridae* y al género *Gammaretrovirus*. Se han identificado al menos 6 subgrupos exógenos (A, B, C, AC, D y T).^{92, 94, 95} Es una de las enfermedades infecciosas más comunes en los felinos. Se ha estimado que un tercio de las muertes de felinos relacionadas con tumores fueron causadas por el FeLV y un número mayor de muertes fueron relacionadas con anemias y enfermedades secundarias causadas por los efectos supresores del virus en médula ósea y el sistema inmune, considerándose una tasa de mortalidad posterior al diagnóstico del 50% en dos años y del 80% en tres años. La vida media de felinos infectados con el FeLV es de 2.4 años. Los signos clínicos asociados a el FeLV están clasificados como tumores, desordenes hematopoyéticos, neurológicos, inmunodeficiencia, enfermedades inmunomediadas, estomatitis y trastornos reproductivos^{55, 88, 93}. La transmisión se da principalmente por saliva, aunque también se puede transmitir por secreciones nasal, lagrimal, leche, heces, semen, fluidos vaginales y transplacentariamente. La pulga del gato (*Ctenocephalides felis*) es considerada una fuente potencial de transmisión. Estudios *in vitro* han demostrado que la pulga puede transmitir el virus por picadura de un gato virémico a uno sano ^{90, 91}. En la actualidad el diagnóstico inicial de la enfermedad se realiza mediante pruebas de antígeno soluble como inmunocromatografías, inmunofluorescencia indirecta y para la detección del ARN viral la RT-PCR. La mayoría de los estudios retrovirales pueden diagnosticar solo la infección, no la enfermedad clínica ^{55, 88, 94}. Existen secuencias de virus endógenos presentes en el genoma del gato doméstico, estos no producen infecciones por si mismos pero se recombinan con FeLV exógenos ⁹⁵.

La tasa de mortalidad de gatos infectados progresivamente por el FeLV en hogares con múltiples gatos, es aproximadamente del 50% en dos años y del 80% en tres años, pero es mucho más baja en gatos estrictamente en el interior de hogares con un solo gato ^{8, 9, 10}.

Aunque el virus fue nombrado por el tumor contagioso que llamo la atención en un principio, la mayoría de los gatos infectados se presentan al veterinario, no por tumores, si no por anemia o inmunosupresión. Varias co-infecciones, incluyendo el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), peritonitis infecciosa felina (PIF), infecciones del tracto respiratorio alto, micoplasmosis hemotropica y estomatitis, son los hallazgos más frecuentes (15%), seguidos por anemias (11%), linfoma (6%), leucopenia o trombocitopenia (5%) y leucemia o enfermedad mieloproliferativa (4%) ¹¹.

Utilizando la PCR se han identificado tasas variables de infección. En Reino Unido se han encontrado tasas elevadas de infección (54%), Colombia (68%), Australia (43%) y Brasil (47.5%). Tasas intermedias en España (35.7%), Suiza (33%) y Estados Unidos (15-20%). Y tasas bajas en Canada (3-4%). Existe muy poca información a niveles local y nacional, para los gatos mexicanos; Ramírez *et al* mencionan que el 96% de gatos muestreados no son inmunizados y que el 76% es positivo al PCR para detectar ADN proviral ⁹⁴.

Etiología

Virus ARN de cadena sencilla que presenta la enzima transcriptasa reversa, la cual le confiere la capacidad de codificar ADN a partir de su ARN viral. Su genoma tiene un tamaño aproximado de 9600 bases.

Conformado por los genes *gag*, *pol* y *env*, además de regiones terminales repetidas largas (LTR) para cada extremo de la hebra (figura 1) los cuales permiten la inserción en el genoma huésped.



Figura 1: Diagrama del genoma del FeLV

Modificado de Hardy, W.D., 1981

El gen *gag* codifica las proteínas del núcleo del virus p15, p12, p27 y p10. El gen *pol* codifica las enzimas necesarias para la replicación e integración viral entre ellas, proteasas, integrasas y transcriptasa reversa. En cuanto al gen *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura, glicoproteínas de superficie SU gp70, y las proteínas de transmembrana TM, gp15_{1,90} (figura 2). El gen *env* tiene una gran variabilidad que influye en el tropismo y la patogenicidad, adicionalmente los eventos de recombinación entre los FeLV endógenos y exógenos pueden involucrar esta región⁹⁴.

En el caso de LTR su región U3 como en otros retrovirus, tiene potencial para promover la transcripción de genes celulares adyacentes, esto se puede asociar con la oncogénesis^{102, 103}.

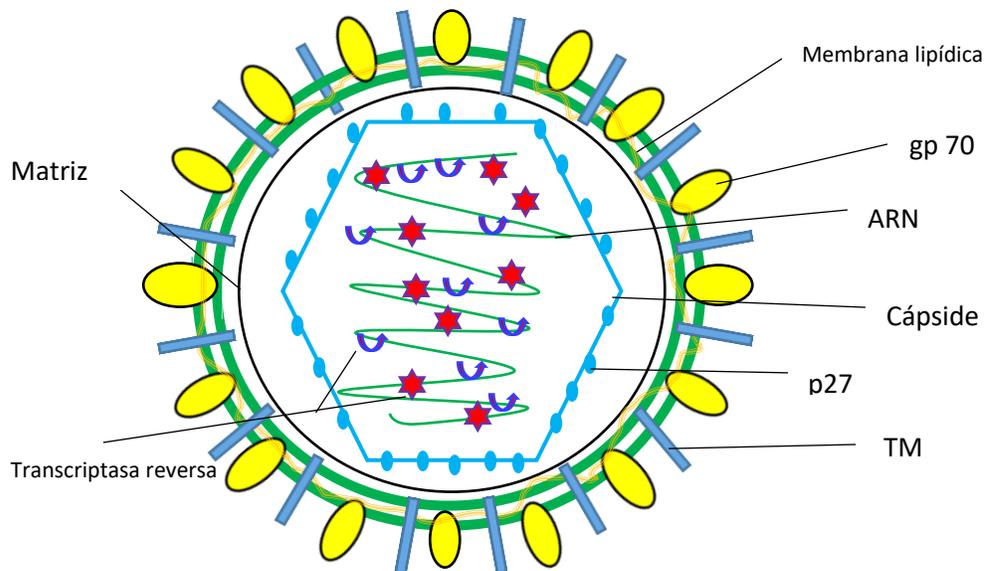


Figura 2: Esquema estructural del FeLV

Modificado de Hardy, W.D., 1981

Subtipos del FeLV

Clasificados de acuerdo con su tropismo celular. El cual es mayormente determinado por la estructura de la envoltura viral. Se han identificado 6 subgrupos: FeLV A, B, C, AC, D y T. Definidos por las variaciones de la secuencia genética de la unidad de glucoproteína de superficie del gen de envoltura (*env*)⁴. El genotipo dominante en gatos infectados es el FeLV A. No hay evidencia de transmisión horizontal natural del FeLV B o C entre gatos y aun así ocurriendo estos subgrupos virales son defectuosos, requieren de la transmisión concomitante de FeLV A.⁸⁴ Los genotipos de FeLV B y particularmente FeLV C son menos comunes.⁹⁴

Ramírez *et al* (2016) han demostrado que algunos retrovirus endógenos son transcripcionalmente activos y es posible encontrar desarrollo de partículas virales por la infección de retrovirus endógenos⁹⁴. También es posible que la infección resulte en la recombinación con estos retrovirus endógenos presentes en el genoma del gato; El FeLV B de esta forma pudo formarse, por el intercambio genético entre FeLV A y elementos provirales endógenos, los cuales son más homólogos con FeLV B que con FeLV A¹⁰⁴.

FeLV A es mínimamente patogénico en ausencia de otras variantes, mientras que FeLV B puede asociarse a linfoma tímico, anemias no regenerativas, diferentes neoplasias linfoides y leucemias mieloides agudas; FeLV C se puede asociar únicamente a aplasia eritrocítica pura⁴.

Patogenia

El FeLV no sobrevive por mucho tiempo fuera del huésped y es rápidamente inactivado por desinfectantes, detergentes, exposición al calor o la desecación. La transmisión por fómites es improbable, aunque se puede llevar a cabo mediante agujas usadas, instrumental quirúrgico contaminado y transfusiones sanguíneas de gatos infectados. La transmisión suele llevarse a cabo mediante “contactos amigables” durante el lamido o acicalado y raramente por mordidas. Los gatos virémicos son la fuente de infección, el virus se encuentra presente en saliva en forma de partículas virales y en sangre como provirus en células mononucleares infectadas, aunque también puede eliminarse en secreciones nasales, heces y leche. En gatas gestantes la viremia puede generar muerte embrionaria, nacidos muertos o gatitos virémicos. El riesgo de infección está ligado al comportamiento y estructura social de los felinos^{26, 105}.

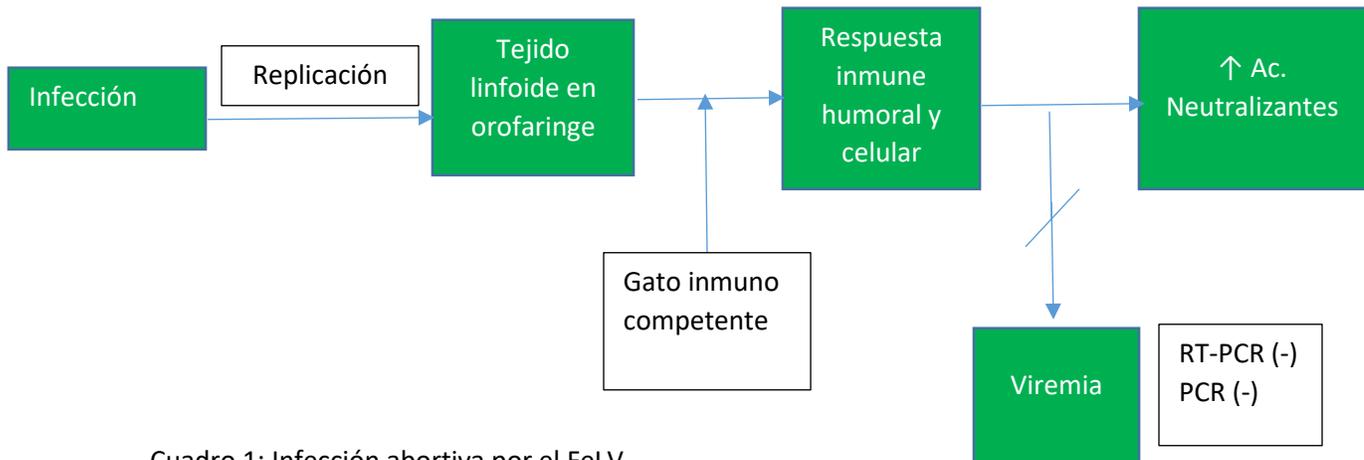
La infección por el FeLV es crónica en la naturaleza y se desarrolla a través de diferentes etapas. Hay una larga fase asintomática en el cual los gatos no muestran signos clínicos¹².

Las etapas de FeLV son infección abortiva, regresiva, progresiva y focal o atípica^{97, 101}. (ver Tabla 1).

Infección abortiva:

Después de la infección el virus empieza a replicarse en el tejido linfoide local de la orofaringe. En los gatos con un sistema inmune funcional, la replicación viral puede ser terminada por una respuesta inmune humoral y celular efectiva. Estos gatos nunca serán

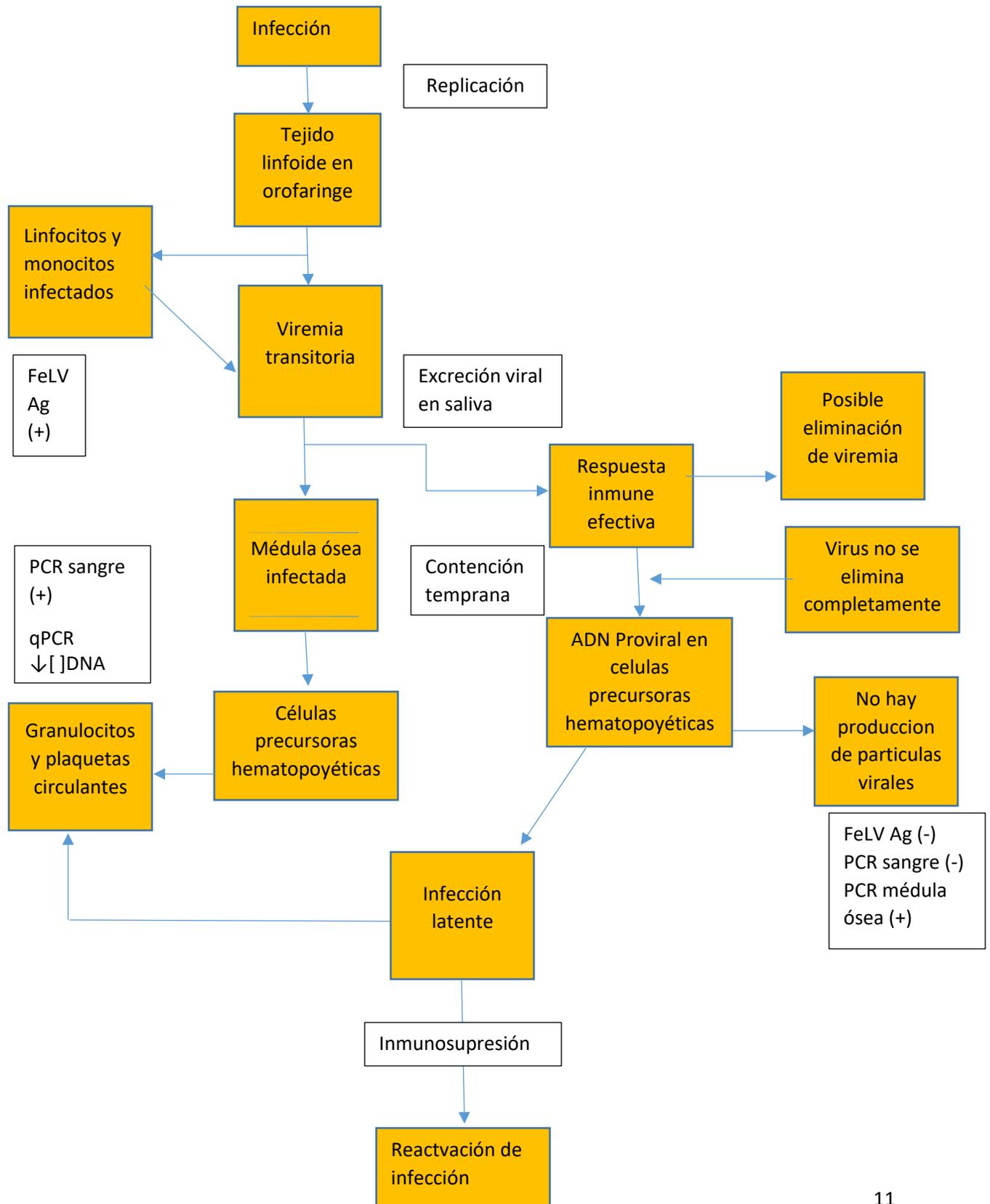
viremicos. Tendrán grandes niveles de anticuerpos neutralizantes. El antígeno del FeLV, el ARN viral o el ADN proviral no podrán ser detectados en la sangre en ningún momento. La infección abortiva posiblemente es causada por una exposición del gato a bajas dosis del FeLV ⁹⁸. Aparentemente pocos gatos o ninguno podrán eliminar por completo la infección de todas sus células (ver cuadro 1).



Cuadro 1: Infección abortiva por el FeLV

Infección regresiva:

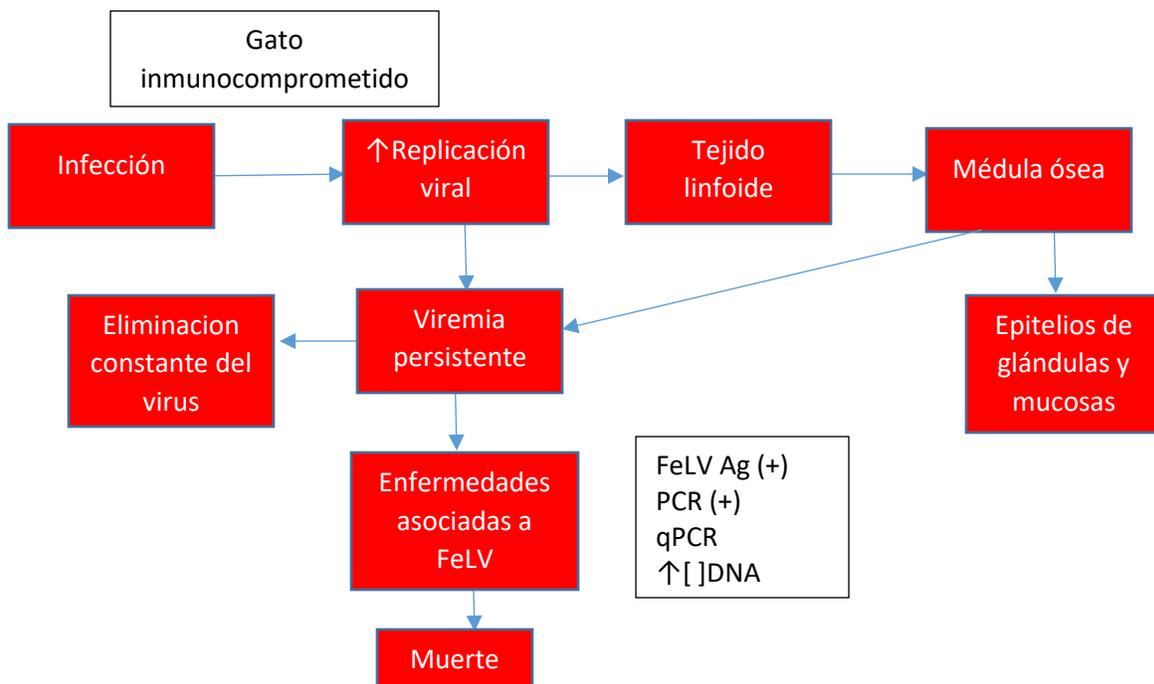
Se desarrolla seguida de una respuesta inmune defectuosa. La replicación viral y la viremia son contenidas poco antes de la infección de la médula ósea. Después de la infección inicial, el virus generado se esparce sistémicamente a través de células mononucleares infectadas (linfocitos y monocitos). Durante esta etapa los gatos tienen resultados positivos en pruebas que detectan antígeno libre en plasma (ELISA) y excretan el virus principalmente en saliva. En estos gatos la viremia (transitoria) es terminada en semanas a meses, en algunos gatos la viremia persiste más de tres semanas, después de este periodo la médula ósea es infectada y los precursores hematopoyéticos infectados desarrollan granulocitos y plaquetas circulantes infectadas. Aun siendo infectada la médula ósea cierto porcentaje de gatos es capaz de eliminar la viremia, sin embargo, no pueden eliminar por completo el virus del cuerpo (infección latente), pues el ADN proviral estará presente en las células troncales. A pesar de que el ADN proviral permanece presente en el genoma celular, no se producen de manera activa partículas virales. En esta fase en todas las pruebas que detectan el antígeno del FeLV serán negativas. Durante la división celular el ADN proviral es replicado, sin embargo no es traducido a proteínas y no se producen partículas virales infecciosas. Los gatos no eliminan el FeLV y no son infecciosos para otros gatos. Un PCR sensible puede detectar provirus en sangre de gatos con infección regresiva que son antígeno negativos ⁹⁹. La infección regresiva puede ser reactivada cuando la producción de anticuerpos disminuye (inmunosupresión) (ver cuadro 2).



Cuadro 2: Infección regresiva de la infección por el FeLV

Infección progresiva:

En los gatos con infección progresiva la infección no es contenida a tiempo, produciendo una replicación extensiva del virus, primero en tejidos linfoides y seguida por la médula ósea y los epitelios de mucosas y glándulas. Permanecen virémicos de manera persistente y son infecciosos para otros gatos por el resto de sus vidas. Desarrollan infecciones asociadas al FeLV y la mayoría de ellos morirán dentro de pocos años. Las infecciones regresivas y progresivas pueden diferenciarse con muestreos repetidos para detectar antígeno viral en sangre periférica; los gatos infectados de manera regresiva se volverán negativos por lo menos 16 semanas después de la infección, mientras que los infectados progresivamente permanecerán positivos. Inicialmente ambas infecciones están acompañadas por una persistencia del ADN proviral del FeLV en la sangre detectado por PCR, diferenciándolas por las cargas del FeLV cuando se miden por qPCR, la infección regresiva es asociada con cargas bajas mientras que la progresiva por cargas altas ^{96, 100}. (Ver cuadro 3).



Cuadro 3: Infección progresiva de la infección por el FeLV.

Infección focal:

Producida por una replicación viral persistente atípica en glándula mamaria, vejiga y ojos. Esta replicación puede llegar a producir de manera intermitente o en bajo grado antígenos. Estos gatos pueden tener un positivo débil o resultados discordantes en la prueba de antígeno, o resultados positivos y negativos pueden alternarse 97.

Fase de la infección del FeLV	Antígeno p27 del FeLV en sangre	Cultivo viral de sangre	ARN viral en sangre	ADN proviral en sangre	Cultivo viral de tejidos	Eliminación viral	Enfermedades asociadas a el FeLV
Progresiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Probable
Regresiva	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	improbable
Abortiva	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	improbable
Focal	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	improbable

Tabla 1: Fases de la infección por el virus de la leucemia felina (FeLV)

Tomado de Hartmann, 2012

Oncogénesis

El FeLV puede causar diferentes tumores, más comúnmente linfoma y leucemia. El mecanismo por el cual el FeLV genera malignidad es por la inserción del genoma del FeLV en el genoma celular, cerca de un oncogen (más común *myc*), activándolo, sobre-expresándolo o suprimiéndolo. Se sugiere que la región U3-LTR de FeLV transactiva las vías de señalización relacionadas con el cáncer, mediante la producción de un transcrito de ARN de 104 bases no codificantes que activa NF kappaB. Estos efectos llevan a una proliferación incontrolada de esa célula (clon). La malignidad se presenta en la ausencia de una respuesta inmune apropiada. El FeLV también puede incorporar el oncogen para formar un virus recombinante como FeLB-B y FeSV. Al entrar a una célula nueva estos virus recombinantes son oncogénicos 41, 42, 88.

Se han identificado 6 sitios de integración común (CIS) para el FeLV: *c-myc*, *flv-1*, *flv-2*, *fit-1*, *pim-1*, *flit-1* 4.

La infección por el FeLV en la población felina naturalmente y con frecuencia resulta en leuquemogenesis. La infección predominantemente genera linfoma de células T después de una latencia prolongada 1, 2, 3.

Interacción entre cepas infectantes del FeLV y elementos endógenos transcripcionalmente activos pero con una replicación defectuosa, dentro del genoma del gato doméstico, son responsables de la generación de leucemogenes 107.

La asociación entre el FeLV y linfomas ha sido claramente establecida, induciendo estas neoplasias en gatito por infección experimental del FeLV. Los gatos infectados naturalmente tienen un riesgo mayor de desarrollar linfoma que los gatos no infectados. La mayoría de los gatos con linfoma eran, al menos en épocas anteriores, cuando la prevalencia del FeLV era

aún más alta, positivos en las pruebas que detectan virus infecciosos o antígenos. Un 80% de linfomas y leucemias en gatos fueron reportados asociados al FeLV ^{43, 44, 45, 46, 47}.

El ADN proviral del FeLV ha sido detectado en linfomas de gatos mayores que resultaron negativos al antígeno del FeLV, sugiriendo que el virus está asociado a una proporción mayor de casos de lo que se pensaba ⁴⁸. El estatus del FeLV en gatos con linfoma aun varia, dependiendo del tipo y la localización del tumor. El linfoma en gatos positivos al antígeno del FeLV se originan en su mayoría de células T; aquellos que son negativos generalmente su origen es de células B ^{49, 50}. Una posible razón es que el FeLV transforma células T maduras e inmaduras, células nulas y posiblemente monocitos. La transformación de las células B maduras no parece ocurrir porque las líneas celulares de linfoma felino y los tumores primarios carecen de expresión de inmunoglobulinas ⁵¹.

Aproximadamente un tercio de las muertes relacionadas con neoplasias en gatos fueron causados por el FeLV e incluso es mayor el número de muertes relacionadas a anemias e infecciones secundarias causadas por los efectos supresores del virus en la médula ósea y el sistema inmune. En años recientes la prevalencia y consecuentemente la importancia de FeLV como un patógeno en gatos ha disminuido ⁷.

Los fibrosarcomas que son asociados al FeLV son causados por el virus del sarcoma viral felino (FeSV), un virus recombinante que se desarrolla *de novo* en gatos infectados con FeLV A por recombinación del genoma de FeLV A y oncogenes celulares (*fes*, *fms* y *fgr*), llevando a una malignidad policlonal con tumores multifocales que surgen simultáneamente después de un corto periodo de incubación. Con la disminución de la prevalencia del FeLV, FeSV también se ha vuelto menos común. Los fibrosarcomas inducidos por FeSV son multicéntricos y usualmente ocurren en gatos jóvenes. FeSV es defectuoso e incapaz de replicarse sin la presencia del FeLV A como virus cooperador que provee proteínas (gen *env*) ^{52, 53, 54, 55}.

La inserción del retrovirus se lleva a cabo cerca de cierto gen celular (figura 3), la transcripción del gen puede ser regulada positivamente por el promotor y la función potenciada de la LTR. Si es integrado dentro de un gen el transcrito podrá ser alterado o interrumpido y la célula podrá adquirir ventajas de crecimiento (ver figura 3) ⁴.

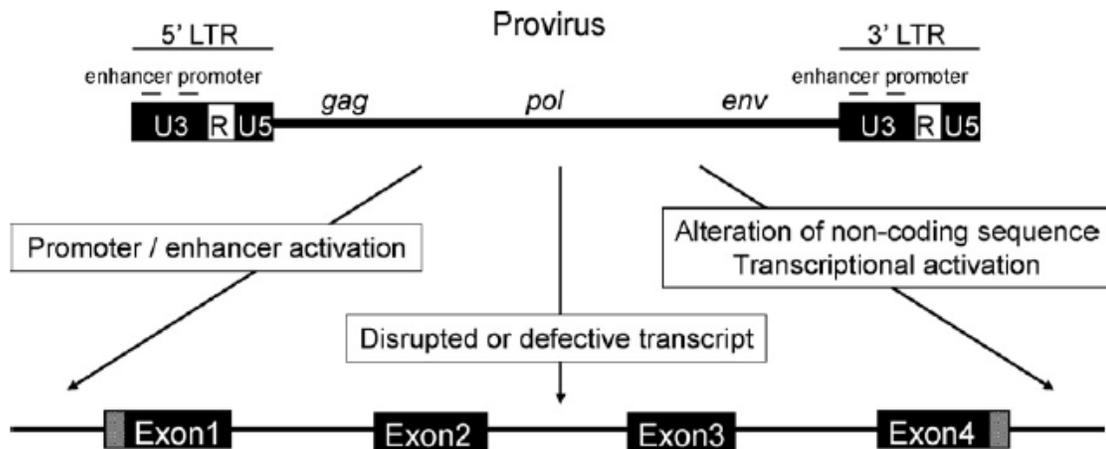


Figura 3: Concepto de la inserción retroviral al genoma celular.

Tomado de Fujino, Y. *et al* 2008

Respuesta inmune

La respuesta inmune es un factor crucial para determinar el resultado de la infección con el FeLV. Muchas investigaciones se centran en la importancia de los anticuerpos virus-neutralizantes (VN) y en los Anti-antígenos de membrana celular asociados a oncornavirus felino (anti-FOCMA), anticuerpos que se piensa que protegen contra la viremia persistente y neoplasias asociadas al FeLV, respectivamente ⁸⁴.

Se cree que los gatos son inmunes al FeLV después de la infección donde se encuentra que permanecen positivos al provirus. Gatos antígeno-negativo y provirus positivos son frecuentemente detectados, su relevancia clínica y el rol en la epidemiología del FeLV, no son claramente comprendidos. Gatos antígeno-negativo y provirus-positivo son considerados portadores del FeLV, siguiendo la reactivación pueden actuar como fuente de infección. Como el provirus está integrado al genoma del gato, es poco probable que sea completamente eliminado. Estos gatos no excretan el virus, pero la reactivación con excreción del virus es posible ⁸⁸.

Altos niveles de linfocitos T citotóxicos efectores específicos del FeLV circulantes aparecen antes que los anticuerpos neutralizantes del virus en gatos que se han recuperado de la exposición al FeLV. En contraste, la infección progresiva con viremia persistente se ha asociado con el silenciamiento del mecanismo inmunitario humoral y celular del huésped ¹³.

Los gatos afectados pueden desarrollar atrofia del timo y depleción de la zona paracortical de linfonodos después de la infección. Linfopenia y neutropenia son comunes. Mecanismos inmunomediados son responsables en casos en que el conteo neutrófilico se recobre con tratamiento de glucocorticoides (neutropenia responsiva a glucocorticoides) ³⁷. En adición los neutrófilos de gatos infectados progresivamente disminuyen su función quimiotáctica y fagocítica. En algunos gatos la linfopenia puede caracterizarse por una pérdida preferencial de linfocitos T cooperadores CD4⁺, resultando en una inversión de la proporción de

CD4/CD8, pero es más común la pérdida sustancial de células cooperadoras y células supresoras citotóxicas (CD8⁺) 18, 19. Existe una reducción de la producción de inmunoglobulinas, función de los neutrófilos disminuida y el agotamiento del complemento. En algunos gatos esta disminuida la producción de IL-2 e IL-4. 9, 24. IFN- γ puede ser deficiente o aumentado, se ha observado un incremento de TNF- α en el suero de gatos infectados. Cada citosina juega un papel importante en la generación de una respuesta inmune normal y la excesiva producción de algunas citosinas como TNF- α también puede causar enfermedad 12.

Las células T de gatos infectados pueden producir significativamente niveles más bajos de factores estimulantes de células B, este defecto se vuelve progresivamente más severo con el tiempo 25.

Durante la vacunación gatos infectados no son capaces de montar una respuesta inmune adecuada, es por eso que se debe considerar vacunar con mayor frecuencia (cada 6 meses) 26.

Los gatos infectados también pueden desarrollar enfermedades inmunomediadas causadas por una respuesta inmune hiperactiva o desregulada hacia el virus. A pesar de que la inmunidad humoral se ve disminuida, aumentos no específicos de IgG e IgM se han observado. La pérdida de actividad de las células T y la formación de complejos antígeno-anticuerpo promueven la desregulación inmune 27. Las enfermedades autoinmunes descritas en gatos infectados con el FeLV incluyen anemia hemolítica autoinmune (AHA), glomerulonefritis, uveítis con deposición de complejos autoinmunes en iris y cuerpo ciliar y poliartritis 28, 29, 30, 31.

Los antígenos que pueden conducir a la formación de complejos inmunes incluyen no solo a partículas virales completas, sino también proteínas libres como gp70, p27 o p15E 32, 33.

El provirus del FeLV puede generar desordenes en médula ósea induciendo la expresión de antígenos en la superficie celular, resultando en destrucción inmunomediada de las células 35.

El mejor conocimiento de la respuesta inmune a la infección por el FeLV ayudaría a resolver las controversias que rodean la vacunación. Todas las vacunas son inactivadas, hay vacunas de virus completos, de múltiples subunidades y recombinantes. También incorporan diferentes fuentes y subgrupos del FeLV. La vacuna ideal deberá proveer protección contra viremias persistente y transitoria. También prever la infección latente y el desarrollo de enfermedades asociadas. Actualmente ninguna de las vacunas disponibles ha demostrado genera suficiente inmunidad mucosal para prevenir la viremia transitoria después de la exposición 84.

A pesar de que la inmunidad celular y la inducción de anticuerpos a otras proteínas virales pueden jugar un papel secundario en la protección de los gatos, se considera que la inducción de anticuerpos virus-neutralizantes que previenen la viremia, son de primordial importancia después de la vacunación. No hay evidencia de que la inclusión de FOCMA en las vacunas

sea beneficioso, si la vacuna protege contra la infección de FeLV, también protegerá contra las enfermedades relacionadas. 84

Factores de riesgo

La tasa de mortalidad de gatos infectados progresivamente por el FeLV en hogares con múltiples gatos es aproximadamente del 50% en dos años y del 80% en tres años, pero es mucho más baja en gatos estrictamente en el interior de hogares con un solo gato 8, 9, 10.

Factores de riesgo para la infección incluyen sexo (machos), edad adulta y acceso al medio externo y la densidad poblacional que promueven el estrés y la mala higiene debido al contacto con otros gatos 5, 6, 94. En el caso de gatos jóvenes la ausencia de una vacunación de rutina, bajo control reproductivo y falta de campañas de prevención se asocian con prevalencias elevadas 94. Los factores de riesgo ligados al comportamiento del gato son: sexo, edad, fenotipo naranja; tomando en cuenta esto los machos naranjas tienden a ser más agresivos aumentando el riesgo de transmisión por heridas y/o sangre 105.

Está claro que el curso clínico es determinado por una combinación de factores del huésped y virales, como el subgrupo que determina las diferencias en el cuadro clínico, por ejemplo, el FeLV B es asociado primariamente con tumores y el FeLV C es asociado con anemia no regenerativa 12.

Es probable que el factor del huésped más importante que determina el curso clínico de gatos infectados con el FeLV es la edad del gato al momento de la infección 14. Gatos neonatos desarrollan una marcada atrofia del timo después de la infección, dando como resultado inmunosupresión severa, debilidad y muerte temprana. Conforme los gatos van madurando adquieren resistencia progresiva. Cuando los gatos más viejos son infectados tienden a presentar infecciones abortivas o regresivas, o si desarrollan la infección progresiva, tienen al menos signos más leves y un periodo prolongado de aparente buena salud 9.

Signos clínicos

Los signos clínicos asociados a el FeLV pueden ser clasificados en tumores, inmunosupresión, desordenes hematológicos, enfermedades inmunomediadas y otros síndromes (neuropatía, desordenes reproductivos y síndrome del gatito debilitado). La inmunosupresión se asocia ocasionalmente con ADN viral no integrado de variantes virales defectuosas de replicación. 15. Estas variantes patogénicas inmunosupresoras como el FeLV-T requieren de una molécula receptora de membrana (Pit1) y una segunda proteína co-receptor (FeLIX) para infectar linfocitos T 16. Esta última proteína es expresada endógenamente y es similar a la proteína de unión al receptor de FeLV-B 17.

Desordenes hematopoyéticos causados por supresión de la médula ósea es un hallazgo común, incluyendo anemias no regenerativas, neutropenia transitoria, persistente o cíclica, puede causar conteos plaquetarios bajos, también es responsable de déficits en la función plaquetaria y en su vida media, resultando en desordenes hemorrágicos secundarios a la producción disminuida por supresión de la médula ósea o infiltración leucémica. Las plaquetas albergan proteínas virales del FeLV como resultado de la infección y los

megacariocitos son blanco frecuente de la infección progresiva ³⁶. Para la mayoría de los mecanismos patogénicos donde el FeLV causa supresión de la médula ósea se requiere una replicación activa del virus. Aunque se ha demostrado que algunos gatos negativos al antígeno del FeLV, la enfermedad regresiva sin viremia es responsable de la supresión de medula ósea ³⁴. En estos gatos el provirus interrumpe o inactiva genes celulares en las células infectadas, adicionalmente los precursores de mielomonocíticos y fibroblastos estromales con provirus que proveen el microambiente de la medula ósea son alterados ³⁵.

La mayoría de las anemias asociadas al FeLV son no regenerativas, causadas por el efecto de supresión de la médula ósea por el virus, resultado de la infección primaria de las células hematopoyéticas madre y células estromales que dan el ambiente de soporte para las células hematopoyéticas ⁸. Otros factores pueden generar anemias no regenerativas en gatos infectados, como la anemia crónica causada por las altas concentraciones de citocinas. En el caso de anemias regenerativas solo se han observado en el 10 % de los casos según Cotter (1991) y se asocian a hemólisis inmunomediada o co-infecciones con *Mycoplasma* ^{89, 36}.

El síndrome tipo panleucopenia felina (FPLS) también conocido como enteritis asociada a el FeLV (EAF) o mieloblastopenia, consiste en una severa leucopenia (>3000 células/ μ l) con enteritis y destrucción del epitelio de las criptas intestinales que imita a la infección del virus de panleucopenia felina (FPV). Parece que este síndrome no es causado por FeLV *per se*, sino por una co-infección con FPV. Se ha demostrado la presencia del antígeno del FPV (inmunofluorescencia) y del virus (microscopia electrónica) en secciones de intestino ³⁷. Los signos clínicos observados usualmente son gastrointestinales, incluyendo diarrea hemorrágica, vómitos, úlceras orales o gingivitis, anorexia y pérdida de peso ^{38, 39}.

Las neoplasias hematopoyéticas, incluyendo leucemia, también se asocian a síndromes de supresión de la médula ósea. El síndrome mielodisplásico (MDS) caracterizado por citopenias de sangre periférica y cambios displásicos en la médula ósea es una etapa previa de leucemia mieloide aguda. Cambios en LTR del FeLV están fuertemente asociados con la inducción de MDS ⁴⁰.

Mielofibrosis caracterizada por una proliferación anormal de fibroblastos, resultado de una estimulación crónica de la médula ósea, como regeneración neoplásica o hiperplásica puede ser causado por el FeLV. En casos severos el endostio dentro de la cavidad medular puede ser eliminado ¹².

Otros síndromes directamente causados por la infección incluyen neuropatía, desordenes reproductivos y el síndrome del gatito debilitado. La mayoría de signos neurológicos vistos por la infección del FeLV, son causados por el linfoma e infiltraciones linfocíticas en cerebro o médula espinal. Anisocoria, midriasis, ceguera central o síndrome de Horner se han descrito en gatos infectados sin cambios morfológicos ⁵⁶.

Las glicoproteínas de la envoltura del FeLV podrían ser capaces de producir un aumento de calcio libre intracelular, conduciendo a la muerte neuronal. Mitchel *et al* (1997) observaron que un polipéptido de la envoltura del FeLV genera neurotoxicidad dependiente de la dosis,

asociada con alteraciones en la concentración del ión calcio intracelular, supervivencia neuronal y crecimiento del proceso neuronal ^{57, 58}.

En algunos gatos infectados el virus podría directamente afectar a las células del SNC, microscópicamente se puede observar degeneración de la materia blanca con dilatación de las vainas de mielina y axones hinchados ⁵⁶.

Las gatas infectadas pueden transmitir el virus transplacentariamente. Fallas reproductivas en forma de resorción fetal, aborto y muerte neonatal es común en infecciones *in utero*. Los abortos suelen ocurrir en el último tercio de la gestación, con expulsión de fetos de apariencia normal. La endometritis bacteriana suele ser acompañada de abortos, particularmente en gatas con neutropenia ⁸.

Los gatitos nacidos de hembras infectadas podrían quedar expuestos al FeLV transplacentariamente, pero una gran exposición también ocurre durante el nacimiento y durante el periodo de lactancia. Algunos gatitos pueden volverse inmunes, pero la mayoría se infectan progresivamente y mueren a edad temprana, por el llamado síndrome del gatito debilitado, caracterizado por incapacidad para amamantarse, deshidratación, hipotermia, atrofia del timo y muerte durante las dos primeras semanas de vida ⁹.

Diagnóstico

El diagnóstico clínico del FeLV es imposible y la infección subyacente por el retrovirus es pasada por alto. Todos los gatos que presentan signos clínicos deben ser muestreados. Muestrear para identificar a los gatos infectados es el pilar de la prevención de la transmisión de los virus. La vacunación contra el FeLV no debe considerarse un sustituto para muestrear a los gatos ⁸⁵.

Varios métodos están disponibles para la detección de la infección por el FeLV. La inmunocromatografía de flujo lateral es el método usado más común, para detectar infecciones transitorias y persistentes, detectando la presencia del antígeno soluble del FeLV, usualmente la proteína del núcleo viral p27. La inmunofluorescencia (IFA) detecta la presencia de anticuerpos estructurales contra el FeLV en el citoplasma de leucocitos y plaquetas infectadas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica para amplificar secuencias específicas de ADN. EL único método reportado para la detección de la infección latente por el FeLV involucra cultivos de médula ósea, el uso de PCR en médula ósea para detectar ADN proviral no se ha reportado. La prueba considerada estándar de oro para el FeLV es el aislamiento viral ^{26, 80, 81, 82, 83, 85}.

Tratamiento

El FeLV causa síndromes clínicos severos y a pesar del hecho de que la infección progresiva es asociada con una disminución de la expectativa de vida, muchos propietarios siguen eligiendo proporcionar terapia para sus gatos infectados por el FeLV, con el tratamiento adecuado los gatos en un hogar con un solo gato pueden vivir varios años con buena calidad de vida ⁵⁵.

Hibridación *in situ* (HIS)

La hibridación *in situ* (HIS) es una técnica que permite la localización precisa de un segmento específico de ácido nucleico dentro de una sección histológica, en el caso del FeLV se podría detectar ADN proviral en el núcleo o ARN viral en citoplasma de las células infectadas. La base subyacente de la HIS es que los ácidos nucleicos, si son preservados adecuadamente dentro de un espécimen histológico, pueden ser detectados mediante la aplicación de una hebra complementaria de ácido nucleico a la cual está unida una molécula informadora. La visualización de la molécula informadora permite la localización de la hebra blanco de ADN o ARN en el tejido. Una de las ventajas del desarrollo de esta técnica para mucosa oral de felinos domésticos, es la facilidad con la que se puede tomar la muestra disminuyendo el estrés para el animal.

Inicialmente los radioisótopos eran los únicos marcadores disponibles y su sensibilidad era alta ⁵⁹. La biotina un marcador no radioactivo, podía ser fácilmente detectada pero disminuye mucho la sensibilidad ⁶⁰. La digoxigenina un esteroide que proviene de la planta *Digitalis* ⁶¹, ⁶². su detección está basada en el uso de anticuerpos anti-digoxigenina de alta afinidad conjugados a una enzima. Las sondas marcadas con digoxigenina son comparables en sensibilidad con sondas con radiomarcadores ⁶³, ⁶⁴.

Metodología para realizar hibridación *in situ*

Preparación de la sonda

Construcción del templado: mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incorporando sitios de unión para polimerasas dentro de las secuencias de iniciadores (Figura 4) ⁶⁵, ⁶⁶. Para enfermedades infecciosas este criterio incluye tiempo de aparición, abundancia dentro de la célula y conservación de la secuencia entre cepas. Todas las cepas de un organismo serán detectadas si se utiliza una secuencia altamente conservada. El “sentido” de la sonda es una consideración importante porque la sonda debe ser complementaria con la secuencia blanco. Para virus de cadena simple (ss) se debe de considerar si el genoma viral es de sentido positivo o negativo.

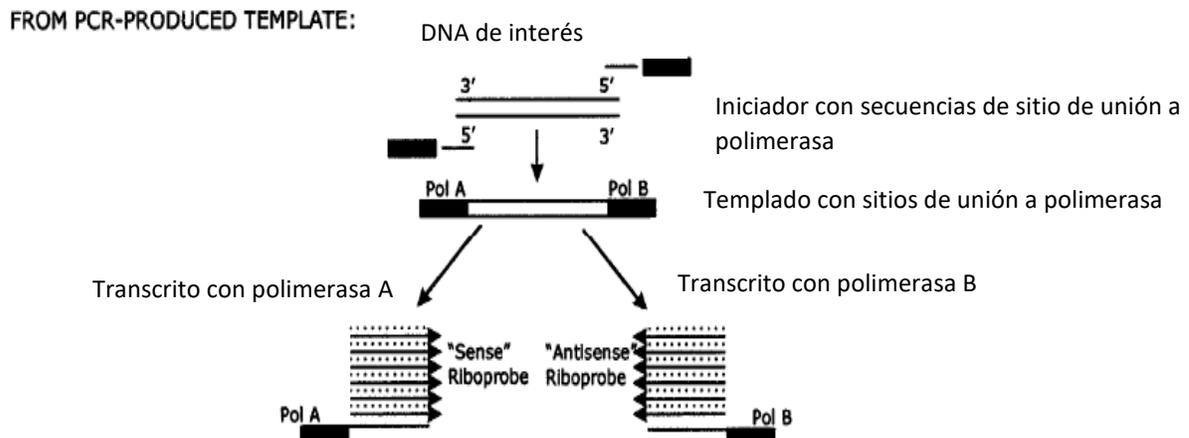


Figura 4: Esquema de preparación de la sonda mediante PCR

Digoxigenina

En el sistema de digoxigenina, el nucleótido marcado es UTP y aproximadamente el 35% de los UTPs en cada mezcla de reacción están marcados, así que estadísticamente cada 25° nucleótido estará marcado ⁶¹.

Fijación

Gran variedad de fijadores químicos se han utilizado con varios resultados ⁶⁷. Fijadores como el alcohol pueden resultar en una fijación pobre, sin embargo, combinaciones de metanol y ácido acético o acetona han sido utilizadas exitosamente con citospins y cultivos celulares ⁶⁸.

Mientras más tiempo permanezca el espécimen en el fijador, será mayor la reticulación (cross-linking) y será menos accesible el blanco, aunque se han obtenido resultados positivos con fijaciones prolongadas incrementando la digestión con proteasas ⁶⁹.

Una característica común de todos los fijadores es que el tejido debe ser fijado lo más pronto posible, por la degradación de los ácidos nucleicos ⁷⁰.

Tratamiento previo de las laminillas

Por la naturaleza de hidratación prolongada del protocolo de la HIS y el uso de enzimas y detergentes en la reacción, un problema serio ha sido el desprendimiento del tejido de las laminillas. Las laminillas electrostáticamente cargadas ayudan a mantener el tejido en las laminillas durante el procedimiento y pueden ser adquiridas comercialmente. Otro método de unión es tratar las laminillas con una solución de aminopropiltrióxido, dejando en las laminillas un residuo de grupos aminoalquil que se unen covalentemente a los aldehídos y cetonas en el tejido, promoviendo su retención ⁷¹.

Exposición del ácido nucleico blanco

Para desenmascarar un ácido nucleico es necesaria una digestión enzimática. Se han utilizado proteinasa K, pronasa y pepsina. En general, si es menos abundante el blanco tiene que ser más vigorosa la digestión. Además, mientras más tiempo haya estado el espécimen en fijador, más vigorosa debe ser la digestión, aunque la sobredigestión lleva a una excesiva pérdida del blanco ⁷².

Desnaturalización

Si el blanco es de doble cadena deberá ser desnaturalizado antes de la hibridación, la manera más fácil de hacer esto es calentar el tejido a 90 °C por 10 minutos y después enfriarlo rápidamente en hielo. Una alternativa es desnaturalizar el ácido nucleico mediante la aplicación de una base fuerte como el NaOH ⁷³.

Hibridación

La base de la hibridación es la atracción y unión de dos moléculas de cadena simple antiparalelas de ácido nucleico. Estas dos moléculas se unen entre sí mediante puentes de

hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas de las bases complementarias. Adenina con timina o uracilo (ARN) y guanina con citosina ⁷³.

Los factores principales que afectan a la hibridación incluyen la concentración de cationes monovalentes, presencia de solventes orgánicos, concentración de GC y temperatura. Otros factores relativamente menores son la longitud del ácido nucleico, el tipo de ácido nucleico y el pH ⁵⁹.

- Cationes monovalentes: la concentración de cationes monovalentes es importante porque estos iones positivos actúan para reducir la repulsión negativa de los grupos fosfatos de los nucleótidos opuestos, juntando ambas cadenas efectivamente. Conforme la concentración de cationes monovalentes disminuye, las cadenas apareadas imperfectamente tienden a separarse. La concentración de cationes monovalentes es ofrecida en forma de citrato de sodio (SSC).
- Formamida: la formamida desestabiliza los puentes de hidrógeno, disminuyendo la temperatura a la que los híbridos se separan y forman.
- Contenido de GC: la estabilidad del dúplex es dependiente de la concentración de GC. Hay tres puentes de hidrógeno entre estas dos bases y solo dos entre timina y adenina. A mayor concentración de GC más estable es el híbrido.
- Temperatura: la temperatura de fusión (T_m) es definida como la temperatura a la que dos cadenas de ácido nucleico están hibridadas al 50 % ^{74, 75}.
- Longitud de la sonda: la longitud de la sonda tiene una influencia relativamente menor. Teóricamente, sondas más largas deberían aumentar la sensibilidad porque tienen mayor cantidad de moléculas de digoxigenina para la detección inmunológica secundaria. Sondas más cortas podrían permitir una mejor penetración por lo tanto aumentaría la sensibilidad, podría ser de importancia en el caso de que haya un número bajo de copias del blanco.
- Ácido nucleico blanco: la estabilidad térmica de híbridos ADN-ADN es mucho menor. Con un incremento de la estabilidad térmica, la hibridación puede llevarse a cabo satisfactoriamente a temperaturas más altas, de este modo se disminuye la tinción de fondo producida por uniones no específicas ⁷⁶.
- pH: en general, los dúplex son estables en rangos de pH de 5-9. Un pH mayor causará que las hebras se separen.
- Factores adicionales: incorporar reactivos como dextran en la solución de hibridación ayuda a incrementar el acceso de la sonda al blanco por sus propiedades hidrofóbicas.
- Controles: deben incluir una laminilla con una sonda del sentido contrario y/o una laminilla sin sonda.
- Otras consideraciones: no todas las reacciones de hibridación llevan a cabo un perfecto apareamiento de las bases, en muchos casos la sonda y el blanco no son completamente homólogos. En estas instancias, es necesario disminuir la astringencia de la reacción de hibridación, usualmente disminuyendo la temperatura de hibridación varios grados. Sin embargo, como la temperatura de hibridación disminuye, la hibridación no específica aumentará, con potencial para crear tinción de fondo ⁵⁹.

Lavados post-hibridación

La aplicación de lavados astringentes después de la hibridación ayuda a deshacerse de cualquier hebra no complementaria que este unida ⁵⁹.

Detección

La detección de la digoxigenina se realiza incubando con un anticuerpo de alta afinidad anti-digoxigenina, el cual esta conjugado a una enzima, usualmente una fosfatasa alcalina (ALP) ^{63, 77}. Es un sistema colorimétrico enzimático. Para el sistema de detección ALP usualmente se utiliza el substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCID) y una sal de nitroazul de tetrazolio (NBT), que forma un precipitado azul oscuro a café, insoluble en agua. Con este sistema las laminillas pueden ser contrateñidas y cubiertas con un montaje permanente ⁵⁹.

Aplicaciones, desventajas y trampas de la HIS

La HIS provee de información similar a otra técnica de biología molecular, pero tiene agregada la ventaja de permitir la localización topológica del ácido nucleico. El conocimiento de histopatología maximiza el potencial de esta técnica permitiendo construir la historia que conecta los cambios morfológicos con la función o acción del ácido nucleico resaltado en el tejido. La HIS se ha utilizado para estudiar infecciones virales. Cuando se usa en combinación con la inmunohistoquímica, la HIS puede diferenciar sitios productivos de sitios no productivos en infecciones virales ^{59, 78}. En virus ADN es posible detectar donde se replican activamente; y para la patogenia viral detectar latencia, identificando las células que albergan al virus ⁷⁹.

La mayor trampa de la HIS es diferenciar entre tinción específica y de fondo, porque algunas sondas se unirán de manera no específica a los componentes del tejido. El conocimiento de histología y los patrones esperados de tinción es esencial ⁵⁹.

PCR

La PCR se ha utilizado en varios países para identificar ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica de gatos infectados. Este método es mucho más sensible que la convencional inmunocromatografía la cual puede producir resultados falsos negativos en gatos sospechosos. En un estudio realizado por Ramírez *et al* (2015) se demostró que el 76% de gatos muestreados fue positivo al PCR para el gen env del FeLV ⁹⁴.

Objetivos

Generales

- Determinar el valor diagnóstico de la HIS para la detección del FeLV en preparaciones citológicas de mucosa oral de gatos sospechoso de tener la infección por el FeLV.
- Evaluar los cambios citológicos de mucosa oral y su relación con la infección por el FeLV.

Particulares

- Estandarizar y validar la técnica de hibridación *in situ* para la detección del FeLV en preparados citológicos de mucosa oral.
- Determinar la correlación de la citología de mucosa oral con los resultados de la inmunocromatografía (SNAP) y HIS.

Materiales y métodos

Población de estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular Veterinaria (Lab A, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. La población de estudio está compuesta por 123 felinos domésticos muestreados entre agosto del 2016 y julio del 2017. Las muestras fueron obtenidas de clínicas veterinarias particulares, pacientes que ingresaron a consulta en el Hospital de Enseñanza en Medicina y Cirugía para Pequeñas Especies de la FESC-UNAM y gatos muestreados a domicilio en la Ciudad de México y Estado de México.

- Preparaciones citológicas:
 - De cada gato se realizaron preparaciones citológicas: estas se realizaron de mucosa oral, por triplicado en portaobjetos convencionales y laminillas electrocargadas ProbeOn Plus, Fisher Scientific, (Pittsburg, USA).
 - El raspado se realizó utilizando hisopos largos (tipo ginecológicos) y estériles. Se procedió a rotar suavemente y con movimientos giratorios el hisopo sobre la mucosa oral incluyendo mejillas y gingiva.
 - Se procedió a realizar los extendidos en los portaobjetos convencionales y se fijaron tanto en seco como en húmedo con alcohol al 96° para posteriormente ser teñidas ^{20, 21}. Estas laminillas fueron utilizadas para el estudio citológico.
 - Las laminillas electrocargadas se tomaron de la misma manera y una vez realizado el frotis se fijaron con acetona.
- Muestras de sangre: la obtención de sangre completa fue a partir de venopunción de la vena yugular o safena, utilizando tubos con EDTA como anticoagulante, para realizar el ensayo de inmunocromatografía de flujo (SNAP) para la detección del antígeno (p27) de FeLV.
- Obtención de células de mucosa oral y saliva:
 - A partir de raspado de la mejilla y gingiva, y colocando el hisopo sublingualmente.
 - Inmediatamente después de la toma de muestra se almaceno la punta del hisopo en tubos de microcentrifuga de 2 ml que contenían 0.5 ml de PBS
 - Se Centrifugaron a 12,000 revoluciones por 5 minutos, obteniendo un micropelet con células de mucosa oral extraídas del hisopo.
 - Se eliminó el sobrenadante y la cabeza del hisopo.
 - Se realizaron 2 lavados con PBS.

- Resuspensión de las células con PBS, para la posterior extracción de ADN genómico, utilizando protocolo para cultivos celulares Biobasic ® 86, 87.

Previamente se realizó el estudio de diversos preparados citológicos de mucosa oral de los felinos muestreados en este estudio con la finalidad de reconocer los diversos patrones celulares presentes en mucosas sanas y/o que cursen con alguna patología, encontrado que la mayoría de los pacientes positivos al antígeno viral p27 detectado mediante (SNAP), presentaban gingivoestomatitis principalmente supurativa séptica.

Se realizaron muestreos adicionales negativos al FeLV conformado por lo menos por 20 animales. En la población experimental, se evaluó la relación de la presencia del FeLV en mucosa oral con los datos de la HIS y citopatología oral. Para dicho efecto los preparados citológicos se utilizaron para la identificación de alteraciones del epitelio de mucosa oral y para la detección de secuencias de ácido nucleico viral con tinciones de Papanicolaou e hibridación *in situ* (HIS) específica para el FeLV.

PCR

Diseño de iniciadores

Para el diseño de los siguientes iniciadores: Fw 5' AAGAAGTCAATTAGTGCCTTAGA 3' y Rv 5' CGCTGTTTTAGTCTTTCTCTTA 3' y para la sonda se utilizaron los programas de bioinformática BioEdit y Primer 3 input (versión 4.0.0) y secuencias de genomas completos del FeLV disponibles en el GenBank con los siguientes números de acceso: L25632, LC144885 (Japón), LC144884, LC144883, AB060732, AF052723, AB672612, NC 001940.1, utilizando como base el primer Rv 5' CGCTGTTTTAGTCTTTCTCTTA 3' utilizado por Ramírez H. *et al* (2016) y Autran M. (2014) 94, 106.

```

          7810      7820      7830      7840
...|...|...|...|...|...|...|...|
L25632 FeLV      ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAGT
LC144885 FeLV Japan ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AGTTAGTGCC TTAGAAAAGT
LC144884 FeLV Japan ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AGTTAGTGCC TTAGAAAAGT
LC144883 FeLV Japan ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AGTTAGTGCC TTAGAAAAGT
AB060732 FeLV Japan complete ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AGTTAGTGCC TTAGAAAAGT
AF052723 FeLV USA complete ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAGT
AB672612 FeLV Japan complete ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAGT
NC 001940.1 FeLV USA complete ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAGT
NC 001940.1 FeLV USA Env ATCCAGGCCC TAGAAGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAGT
Plasmido Env      ATTCAGGCCT TAGAGGAGTC AATTAGTGCC TTAGAAAAAT
FeLV Fw Env      ----- --AAGAAGTC AATTAGTGCC TTAG-----

```

```

          7850      7860      7870      7880
...|...|...|...|...|...|...|...|
FeLV Rv Env
L25632 FeLV      CCCTGACCTC CCTTCTGAA GTAGTCTTAC AAAACAGACG
LC144885 FeLV Japan CCCTAACCTC CCTCTCTGAG GTAGTCTTAC AAAATAGACG
LC144884 FeLV Japan CCCTAACCTC CCTCTCTGAG GTAGTCTTAC AAAATAGACG
LC144883 FeLV Japan CCCTAACCTC CCTCTCTGAG GTAGTCTTAC AAAATAGACG
AB060732 FeLV Japan complete CCCTGACCTC CCTCTCTGAG GTAGTCTTAC AAAATAGACG
AF052723 FeLV USA complete CCCTGACCTC CCTTCTGAA GTAGTCTTAC AAAACAGACG
AB672612 FeLV Japan complete CCCTGACCTC CCTCTCTGAG GTAGTCTTAC AAAATAGACG
NC 001940.1 FeLV USA complete CCCTGACCTC CCTTCTGAA GTAGTCTTAC AAAACAGACG
NC 001940.1 FeLV USA Env CCCTGACCTC CCTTCTGAA GTAGTCTTAC AAAACAGACG
Plasmido Env      CCTTGACTTC CCTTCTGAA GTAGTCTTAC AAAACAGGCC

```

```

          7890      7900      7910      7920
...|...|...|...|...|...|...|...|
FeLV Rv Env
L25632 FeLV      GGGCCTAGAT ATTCTATTCT TACAAGAGGG AGGGCTCTGT
LC144885 FeLV Japan AGGCCTAGAT ATTCTGTTCT TACAGGAGGG AGGGCTTTGT
LC144884 FeLV Japan AGGCCTAGAT ATTCTGTTCT TACAGGAGGG AGGGCTTTGT
LC144883 FeLV Japan AGGCCTAGAT ATTCTGTTCT TACAGGAGGG AGGGCTTTGT
AB060732 FeLV Japan complete AGGCCTAGAT ATTCTGTTCT TACAGGGGGG AGGGCTTTGT
AF052723 FeLV USA complete GGGCCTAGAT ATTCTATTCT TACAAGAGGG AGGGCTCTGT
AB672612 FeLV Japan complete AGGCCTAGAT ATTCTGTTCC TACAGGAAGG AGGGCTTTGT
NC 001940.1 FeLV USA complete GGGCCTAGAT ATTCTATTCT TACAAGAGGG AGGGCTCTGT
NC 001940.1 FeLV USA Env GGGCCTAGAT ATTCTATTCT TACAAGAGGG AGGGCTCTGT
Plasmido Env      AGGCCTAGAT ATTCTGTTCC TACAGGAGGT AGGGCTATGT

```

```

          7930      7940      7950      7960
...|...|...|...|...|...|...|...|
FeLV Rv Env
L25632 FeLV      GCCGCATTAA AAGAAGAATG TTGCTTCTAT GCGGATCACAA
LC144885 FeLV Japan GCCGCCTTAA AAGAAGAGTG TTGCTTTTAT GCAGATCACAA
LC144884 FeLV Japan GCCGCCTTAA AAGAAGAGTG TTGCTTTTAT GCAGATCACAA
LC144883 FeLV Japan GCCGCCTTAA AAGAAGAGTG TTGCTTTTAT GCAGATCACAA
AB060732 FeLV Japan complete GCCGCCTTAA AAGAAGAATG TTGCTTTTAT GCAGATCACAA
AF052723 FeLV USA complete GCCGCATTAA AAGAAGAATG TTGCTTCTAT GCGGATCACAA
AB672612 FeLV Japan complete GCCGCCTTAA AAGAAGAGTG TTGCTTTTAT GCAGATCACAA
NC 001940.1 FeLV USA complete GCCGCATTAA AAGAAGAATG TTGCTTCTAT GCGGATCACAA
NC 001940.1 FeLV USA Env GCCGCATTAA AAGAAGAATG TTGCTTCTAT GCGGATCACAA
Plasmido Env      GCAGCGTTAA AAGAAGAATG TTGTTTTTAT GCAGATCACAA

```

		7970	7980	7990	8000

<i>FeLV Rv Env</i>					TAAGAGAAAG
<i>L25632 FeLV</i>	CCGGACTCGT	CCGAGACAAT	ATGGCTAAAT	TAAGAGAAAG	
<i>LC144885 FeLV Japan</i>	CCGGACTCGT	CCGGGACAGT	ATGGCCAAGC	TAAGAGAAAG	
<i>LC144884 FeLV Japan</i>	CCGGACTCGT	CCGGGACAGT	ATGGCCAAGC	TAAGAGAAAG	
<i>LC144883 FeLV Japan</i>	CCGGACTCGT	CCGGGACAGT	ATGGCCAAGC	TAAGAGAAAG	
<i>AB060732 FeLV Japan complete</i>	CCGGACTCGT	CCGGGACAGT	ATGGCCAAGT	TAAGAGAAAG	
<i>AF052723 FeLV USA complete</i>	CCGGACTCGT	CCGAGACAAT	ATGGCTAAAT	TGAGAGAAAG	
<i>AB672612 FeLV Japan complete</i>	CCGGACTCGT	CCGGGACAGT	ATGGCCAAGT	TAAGAGAAAG	
<i>NC 001940.1 FeLV USA complete</i>	CCGGACTCGT	CCGAGACAAT	ATGGCTAAAT	TGAGAGAAAG	
<i>NC 001940.1 FeLV USA Env</i>	CCGGACTCGT	CCGAGACAAT	ATGGCTAAAT	TGAGAGAAAG	
<i>Plasmido Env</i>	CCGGATTAGT	CCGAGATAAC	ATGGCTAAAT	TAAGAGAAAG	
		8010	8020	8030	8040

<i>LeVF Rv</i>	ACTAAAACAG	CG			
<i>L25632 FeLV</i>	ACTAAAACAG	CGGCAACAAC	TATTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>LC144885 FeLV Japan</i>	ACTAAAACAG	CGGCAGCAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>LC144884 FeLV Japan</i>	ACTAAAACAG	CGGCAGCAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>LC144883 FeLV Japan</i>	ACTAAAACAG	CGGCAGCAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>AB060732 FeLV Japan complete</i>	ACTAAAACAG	CGGCAGCAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>AF052723 FeLV USA complete</i>	ACTAAAACAG	CGGCAACAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>AB672612 FeLV Japan complete</i>	ACTAAAACAG	CGACAGCAAC	TGTTTGACTC	CCAGCAGGGA	
<i>NC 001940.1 FeLV USA complete</i>	ACTAAAACAG	CGGCAACAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>NC 001940.1 FeLV USA Env</i>	ACTAAAACAG	CGGCAACAAC	TGTTTGACTC	CCAACAGGGA	
<i>Plasmido Env</i>	ACTAAAACAG	CGAATTCTAGA	TGC---ATTG	GCGA-----	

Tabla 2: Alineamiento de secuencias de un fragmento del gen env del FeLV con las secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR.

Extracción del ADN:

- Kit de extracción comercial Qiagen
 - PBS
 - Cloruro de sodio 150 mM
 - Fosfato de potasio 50 mM
1. El cloruro de sodio suele formar precipitados, se calentó a 56°C para disolverlo.
 2. Se precalentó el baño de agua a 56 °C+
 3. Se centrifugó a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, se removió sobrenadante. Se agregaron 200 µl de PBS, 200 µl de Buffer CL y 20 µl de proteinasa K; se homogenizo.
 4. Se incubó a 56°C por 10 minutos hasta que las células se lisaron completamente, se pasó por el vortex ocasionalmente.
 5. Se agregaron 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló.
 6. Se pasó la mezcla al “EZ-10 spin column” y se colocó en un tubo colector de 2 ml, centrifugó a 900 x g (12000 rpm) por un minuto y se descartó el contenido del tubo colector.
 7. Se agregaron 500 µl de solución CW1 y se centrifugó por un minuto a 900 x g (12000 rpm) y se decantó.
 8. Se agregaron 500 µl de solución CW2 y se centrifugó por un minuto a 900 x g (12000 rpm) y se decantó
 9. Se colocó la columna vacía en el tubo colector y se centrifugó por 2 minutos a 900 x g (12000 rpm) para secar la membrana. Se descartó el sobrenadante y se pasó la columna a un tubo limpio de 1.5 ml. Se incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos hasta que el etanol se evaporó por completo.

10. Se agregó 50 µl de buffer CE directamente en el centro de la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugo por 2 minutos a 900 x g (12000 rpm) para remover el ADN.
11. Se etiquetó y almaceno a -4 °C.

El ADN que fue genómico obtenido a partir de células de mucosa oral y de sangre periférica de un felino FeLV antígeno positivo, provirus positivo fue utilizado como templado en la PCR para determinar la presencia del provirus del FeLV. Se utilizaron iniciadores que amplifican un producto de 199 pb, los cuales se utilizaron para realizar gradientes de temperatura y curvas de concentración de cloruro de magnesio y templado para estandarizar las condiciones de la PCR.

Mezcla para PCR

Cada tubo contenía 25 µl de Master mix (Sigma-Aldrich), 1µl del ADN blanco (plásmido env, proporcionado por el laboratorio de Virología FES-Cuautitlán UNAM), 1 µl de cada solución de iniciadores Fw y Rv, y 22 µl de agua bidestilada.

Amplificación

El programa de PCR utilizado consistió en un ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos seguido de 40 ciclos: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, alineación 60 °C por 1 minuto, extensión o elongación 72°C por 1 minuto. Tras el último ciclo del PCR se realizó una elongación final a 72°C por 10 minutos.

Visualización de los productos

Los productos de amplificación fueron analizados en un gel de electroforesis de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio y fueron separados por electroforesis, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) como referencia. La electroforesis fue realizada en buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) por hora y media a 90 V. Los resultados fueron visualizados bajo un transiluminador de luz ultravioleta, para confirmar la amplificación del producto esperado de 199 pb.

Obteniendo resultados satisfactorios pues las bandas del gel de electroforesis marcan un producto de 200 pares de bases, demostrando la sensibilidad del estudio, se utilizaron diferentes concentraciones de MgCl₂: 1.5 mg/µl, 1.75 mg/µl, 2 mg/µl y 2.25 mg/µl, templado: 80 ng/µl, 50 ng/µl, 25, ng/µl, 12.5 ng/µl y 6.25 ng/µl y temperatura: 53°C, 54 °C, 55 °C y 56 °C y se demostró su sensibilidad al poder detectar bajas concentraciones de ADN proviral. Adicionalmente para poder corroborar si realmente eran negativos los resultados de la HIS, se obtuvo ADN genómico de dos felinos domésticos a partir de hisopado de mucosa oral y saliva, obteniendo concentraciones de ADN de 4 ng/µl y 12.2 ng/µl en la cuantificación, en el gel de agarosa, (figura 9) se pudo observar que ambos gatos fueron positivos a FeLV.

Marcaje de la sonda

Se utilizó el kit de síntesis para sonda PCR DIG® (Roche) para generar una sonda marcada con DIG-dUTPs. Como templado para el diseño de la sonda se utilizó plásmido que contenía

un fragmento del gen env, proporcionado por el laboratorio de Virología FESC-UNAM. Se observaron 3 bandas que según el marcador de pares de bases estaban cercanas a los 200 pares de bases, coincidiendo con lo obtenido (199 pares de bases) en el alineamiento realizado con BioEdit de los iniciadores con las secuencias para EnFeLV's, Para el marcaje de la sonda con digoxigenina se puede observar que la banda fue mayor debido a que presento un número más alto en pares de bases correspondiendo al 25% que se agregan con el marcaje de la sonda, obteniendo un resultado satisfactorio (figura 6). Se cuantificó la sonda con una concentración de 392.5 ng/μl.

Mezcla para marcaje de la sonda

El marcaje se realizó en tubos para PCR de 0.2 ml con un volumen total de 50 μl.

Se preparó un vial con 10 μl de buffer con MgCl₂, 2 μl de cada solución de iniciadores para env Fw y Rv, 1.5 μl de mix de enzima, 2 μl de templado y 72.5 μl de agua bidestilada. Se colocaron 45 μl de esta mezcla en dos tubos para PCR.

1. Sonda DIG: se le agrego 5 μl de Mix de síntesis para sonda PCR DIG.
2. Control no marcado: se le agrego 5 μl de solución de dNTP stock.

Se utilizó el mismo programa usado para la amplificación de PCR.

Hibridación *In Situ* (HIS)

Las reacciones de HIS se realizaron en una estación de trabajo Microprobe Manual Staining System, Fisher Scientific, (Pittsburg, USA) siguiendo un protocolo estándar. La hibridación se realizó con sondas específicas para el FeLV marcadas con digoxigenina.

Soluciones de lavado:

Solución de citrato salino sódico (SSC) 0.5x

1 litro:

- 25 ml 20x SSC
- 970 ml agua bidestilada
- 4 ml Tween 20
- 2.5 ml Brij 35 solution, 30% w/v

SSC 0.2x

1 litro:

- 10 ml 20x SSC
- 985 ml agua bidestilada
- 4 ml Tween 20
- 2.5 ml Brij 35 solution, 30% w/v

Buffers y soluciones:

Buffer 1 pH 7.5

2 litros:

- 24.22 g 100 mM Tris
- 17.53 g 150 mM NaCl
- pH a 7.5 con HCL
- Aforar a 2 litros

Buffer 2 pH 9.5

2 litros:

- 24.22 g 100 mM Tris
- 11.69 g 100 mN NaCl
- 20.33 g 50 mM MgCl₂·6H₂O
- pH a 9.5 con HCl
- Aforar a 2 litros

1x automation buffer

2 litros: agregar 200 ml de 10x automation buffer a 1800 ml de agua bidestilada.

1x automation buffer pH 2

500 ml:

- 50 ml 10x automation buffer
- 400 ml agua bidestilada
- pH a 2 con HCL
- Aforar a 500 ml
- Almacenar a 4 °C

1x Automation Buffer pH 2 + 0.25% pepsin: se prepara al momento que se usará.

Solución de hibridación

50 ml:

- 7.5% condroitin sulfato
- 5x SSC
- 50 mM buffer de fosfatos
- 0.25% agente bloqueador
- 20 ml agua destilada
- 22.5% formamida desionizada

Solución de cromógeno

- 1 ml Buffer 2
- 4.5 µl NBT
- 3.5 µl BCID

Verde Rápido 1%

- 5 g de verde rápido FCF
- 500 ml de agua bidestilada
- Mezclar
- Agregar timol como preservativo

PCR DIG:

Protocolo modificado para hibridación *in situ* (HIS) en estación de trabajo Fisher Microprobe:

1. Rehidratación de células en etanol al 100% por 5 minutos, etanol al 95% por 2 minutos y etanol al 70% por 2 minutos. Durante la rehidratación preparar 25 mg de pepsina en 10 ml de Automation Buffer con un pH de 2, revolver en una platina magnética.
2. Sumergir laminillas en Automation Buffer y posteriormente cargar laminillas en el soporte, evitando la formación de burbujas.
3. 1X Automation Buffer por un minuto y secar en cojinete.
4. Agregar por capilaridad 250 µl de solución de pepsina al 0.25%, para cada par de laminillas, secar en cojinete.
5. Agregar por capilaridad 250 µl de solución de pepsina al 0.25%, incubar a 37 °C por 10 minutos, a 105 °C por 8 minutos, secar en cojinete.
6. 1X Automation Buffer, secar en cojinete 4x.
7. Agregar por capilaridad 250 µl de formamida al 100% por cada par de laminillas, incubar a 105 °C por 5 minutos (ayuda a calentar las laminillas y la solución de la sonda suba mejor), secar en cojinete.
8. Hibridación: por cada par de laminillas se agregó por capilaridad 1 µl de sonda marcada con DIG y 200 µl de solución de hibridación, evitando la formación de burbujas, sobre todo en el sitio de la muestra. Incubar a 105 °C por 5 minutos, a 37°C por 60 minutos. Secar en cojinete.
9. Sumergir en solución de citratos (SSC) 0.5X, secar en cojinete 2x.
10. Sumergir en SSC 0.2X, secar en cojinete 2x.
11. Sumergir en SSC 0.2X, incubar a 37°C por 5 minutos. Secar en cojinete.
12. Sumergir en Buffer 1 al cual previamente se le agrego 0.3% de Triton X y 1 ml de suero ovino (ayudando a sellar mejor antes del antidig y reduce el fondo), secar en cojinete.
13. Agregar por capilaridad 250µl de Buffer 1 con 0.3% de Triton X y suero ovino, 0.5 µl de Anti-dig-AP. Incubar a 37 °C por 45 minutos, secar en cojinete.
14. Buffer 1, secar en cojinete.

15. Remover laminillas del soporte y agitar en Automation Buffer por 2 minutos, eliminando los remanentes de anti-dig.
16. Regresar laminillas al soporte, secar en cojinete evitando la formación de burbujas.
17. Sumergir en Buffer 2 previamente agregar 0.4% de Tween y 0.25% de Brij (cambian el pH y ayudan a dar color), secar en cojinete.
18. Agregar mediante capilaridad para cada par de laminillas 250 µl de cromógeno en buffer 2 (para 1 ml de buffer 2, agregar 4.5 µl de NBT y 3.5 µl de BCID), incubar a 37 °C por 45 minutos. Mezclar anti-dig con cromógeno y observar la reacción, ayudando a checar si los reactivos funcionan adecuadamente o si no se agregó el anti-dig. (figura 7)
19. Sumergir laminillas en agua destilada (dw), secar en cojinete y remover del soporte.
20. Teñir laminillas en verde rápido durante 5 minutos, rehidratar con etanol al 70% y 96% realizando pases rápidos, pues se puede remover el anti-dig.
21. Realizar montaje con Entellan.

Citología:

Tinciones citológicas: las laminillas fijadas en seco se tiñeron con una tinción tipo Romanowsky (hemocolorante rápido®, Hycel de México SA de CV, cat.548), mientras que las laminillas fijadas en húmedo se tiñeron con Papanicolaou ^{20, 21}.

Evaluación de los hallazgos citopatológicos y distribución viral por HIS.

- a) Evaluación de la celularidad: el tipo, cantidad de células y población bacteriana se evaluaron bajo los criterios universalmente establecidos ^{20, 21}.

Inicialmente se dividieron en dos rubros:

- 1.- Población celular inalterada
- 2.- Población celular alterada. En este rubro con base a la celularidad observada se clasificó como:
 - Inflamación supurativa séptica o aséptica.
 - Inflamación piogranulomatosa.
 - Inflamación granulomatosa.
 - Inflamación eosinofílica.
 - Neoplasia. Aquí se aplicaron los criterios universalmente conocidos para clasificar la estirpe histológica, comportamiento biológico y grado de diferenciación.

- b) Distribución viral: las laminillas serían subjetivamente evaluadas sobre una escala de 5 puntos: 1= sin alteración/no señal de hibridación, 2= hasta 25%, 3= 25-50%, 4= 50-75% y 5= 75-100%. Adicionalmente, se tomaron imágenes digitales de 3-6 campos representativos con el objetivo de seco fuerte (microscopio Olympus®) y se determinaron el número total de células positivas por área utilizando el software Image-Pro plus.

Resultados

De los 123 gatos muestreados se realizaron inmunocromatografías específicas para el FeLV de los cuales 15 resultaron positivos a la presencia del antígeno (ver anexo), además de dichos

gatos se realizaron citologías de mucosa oral con la finalidad de estudiar la celularidad normal (figura 5) y las diferentes alteraciones que se pudieran observar en gatos infectados con el FeLV, los cuales presentaron en su mayoría gingivoestomatitis supurativa séptica con o sin hemorragia.

Se realizaron 54 reacciones de hibridación *in situ* obteniendo resultados negativos, por la pérdida parcial o total de la muestra y por ausencia de una reacción visible en los núcleos de células de mucosa oral (figura 8).

Para los ensayos de PCR con iniciadores diseñados a partir del iniciador Rv (Ramírez H. *et al* (2016) y Autran M. (2014)) para el gen env, se observaron amplificaciones correspondientes con el producto esperado de 199 pb (figura 6). Se realizaron amplificaciones adicionales para estandarizar la reacción mediante gradientes de temperatura, curvas de concentración de templado y de cloruro de magnesio. Posteriormente se realizaron 2 amplificaciones adicionales con ADN genómico obtenido a partir de células de mucosa oral mediante un protocolo modificado descrito por Chavez, *et al* (2016) y Dean *et al* (2008), los cuales presentaron una baja concentración de ADN, sin embargo ambas muestras resultaron positivas a env FeLV (figura 9).

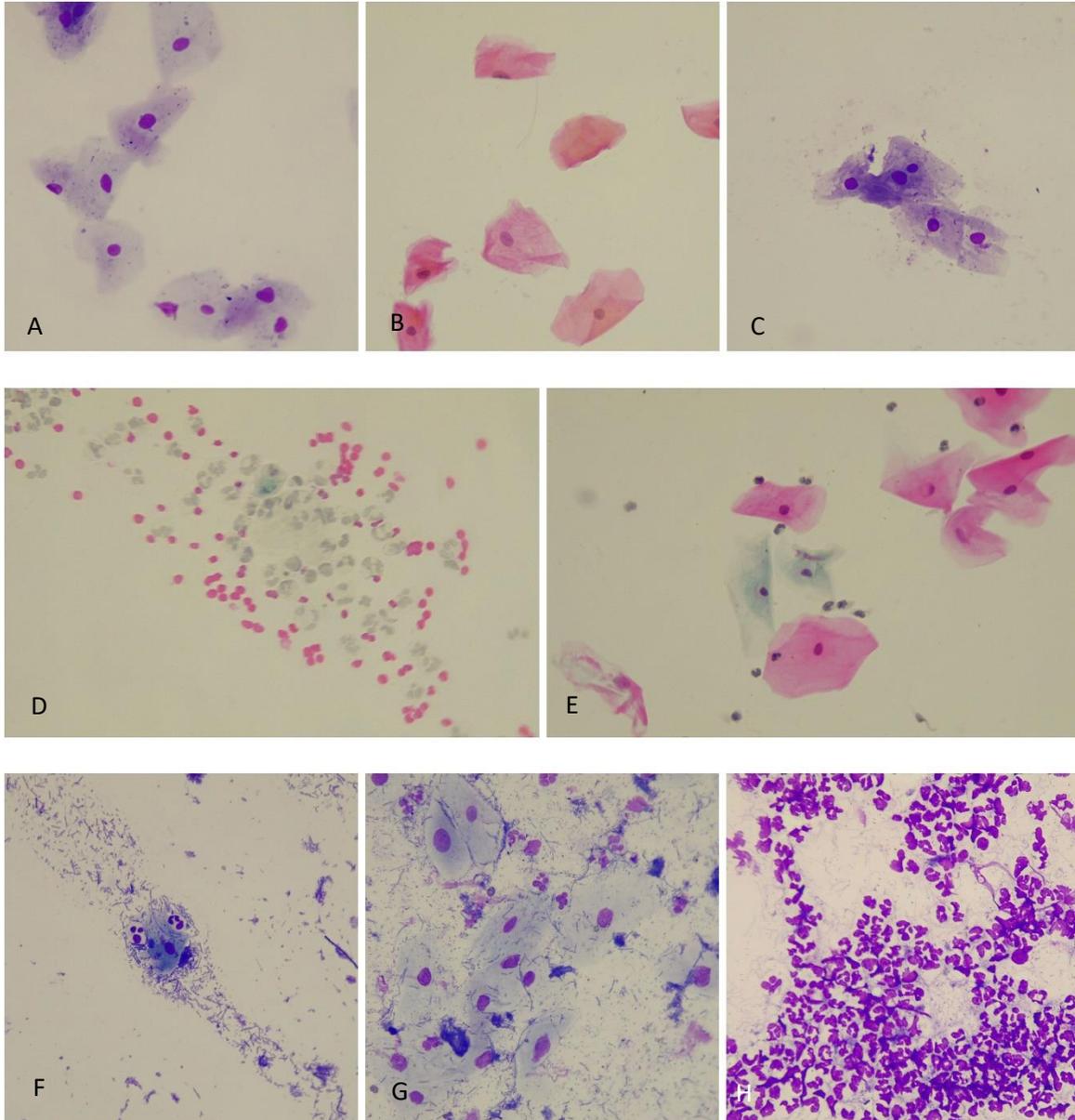


Figura 5: Citologías de mucosa oral en felinos domésticos aparentemente sanos.

A, B y C: ejemplos de mucosa oral normal de felino doméstico, se pueden observar células superficiales nucleadas y anucleadas. D: gingivoestomatitis hemorrágica supurativa séptica, E: gingivitis supurativa séptica leve. F y G: gingivitis supurativa séptica moderada. H: gingivoestomatitis supurativa séptica severa.

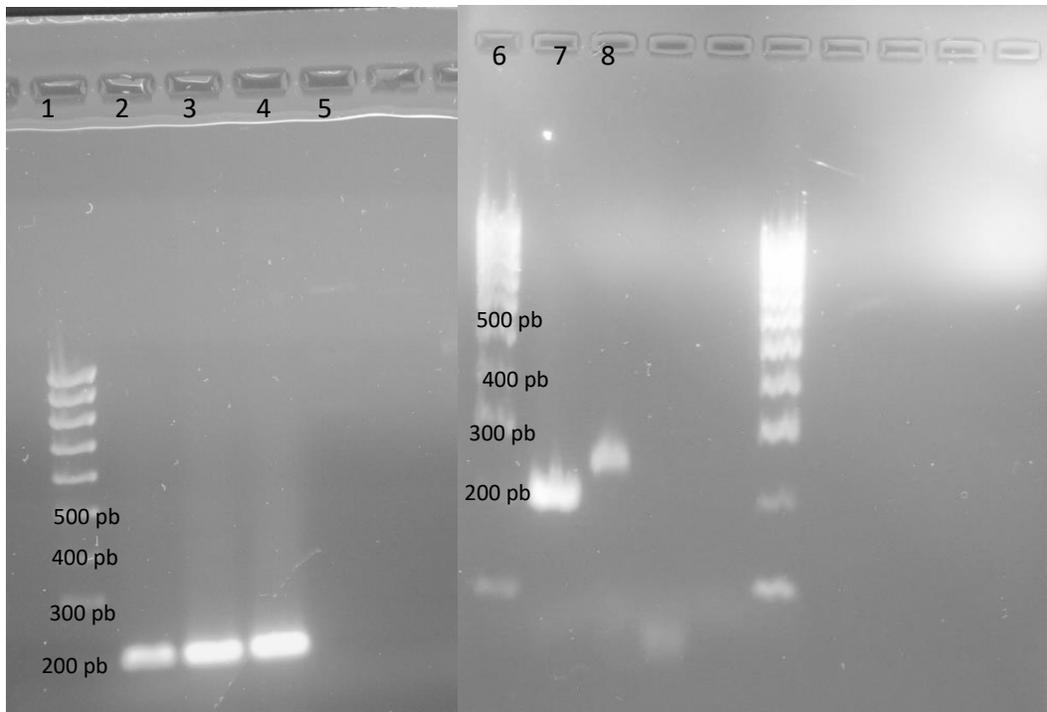


Figura 6: Geles de agarosa mostrando los resultados obtenidos en la PCR de env del FeLV

1, 6, 11: marcadores de pares de bases (pb).

2-5: PCR para env FeLV, demostrando el correcto funcionamiento de los iniciadores diseñados a diferentes temperaturas. Se puede observar que las bandas presentan un tamaño aproximado de 200 pb coincidiendo con el producto de 199 pb. 2: 53 °C, 3: 54 °C y 4: 55 °C.

7-8: Marcaje de la sonda con DIG: se puede observar que la banda 8 presenta mayor tamaño coincidiendo con el 25% de nucleótidos agregados para el marcaje del templado.

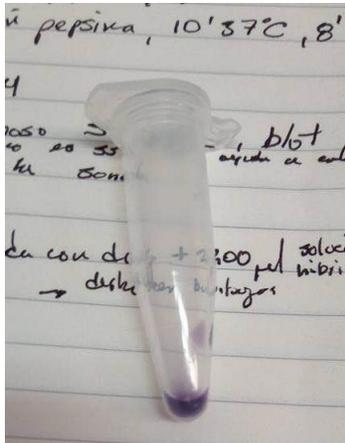


Figura 7: Tubo de microcentrifuga con reacción positiva DIG-anti-DIG

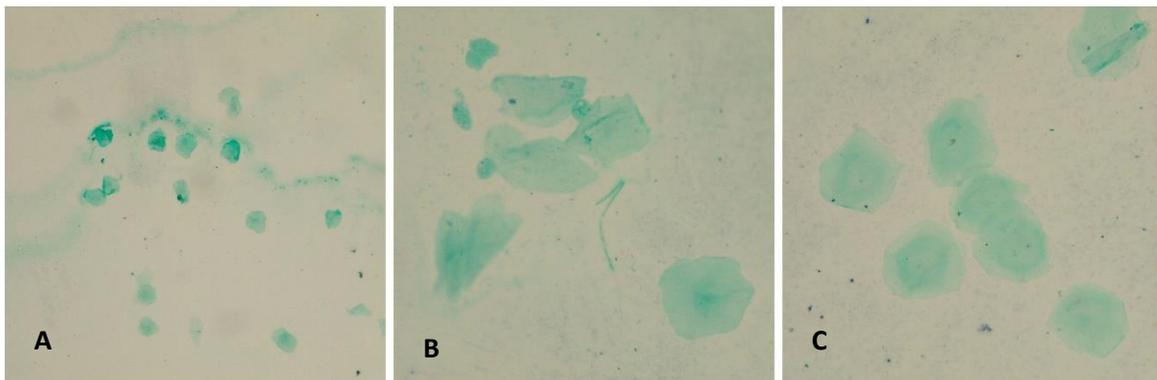


Figura 8: HIS específica para el FeLV en preparados citológicos de mucosa oral de felinos domesticos

Figura A, B y C: se observan células de mucosa oral a 10x, 40x y 100x respectivamente, donde solo se observa detalle citoplasmático debido al contraste del verde rápido, sin evidencia de señales de hibridación (color café-azul) en núcleos.

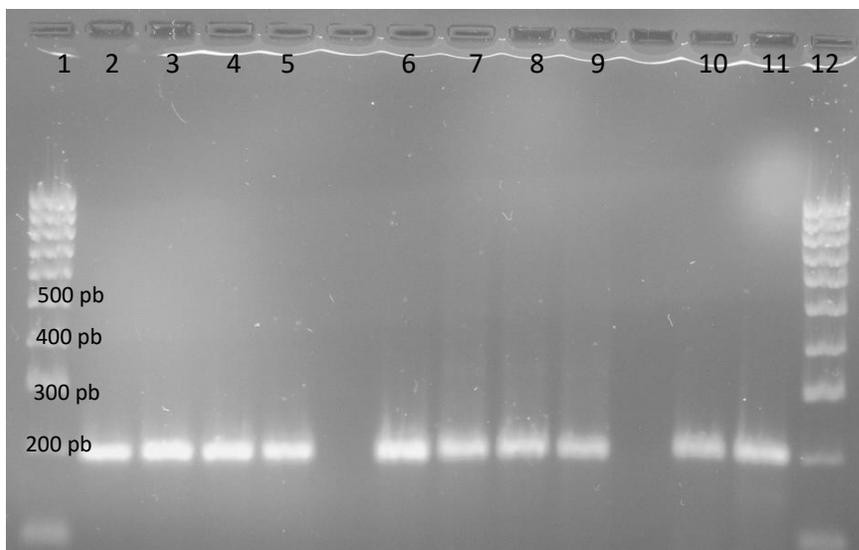


Figura 9: Gel de electroforesis de curvas de PCR para env FeLV

1 y 12: marcadores de peso molecular. Curva de templado, 2: 50 ng/ μ l, 3: 25 ng/ μ l, 4: 12.5 ng/ μ l, 5: 6.25 ng/ μ l.
 Curva de concentración de Cl_2Mg , 6: 1.5 μ l, 7: 1.75 μ l, 8: 2 μ l, 9: 2.25 μ l.
 PCR env FeLV de mucosa oral. 10: positivo, 4 ng/ μ l; 11: positivo, 12.2 ng/ μ l

Discusión

La población de estudio en el presente trabajo constó de 123 felinos domésticos muestreados en el Estado de México y CDMX. Se evaluaron las características citológicas de cada animal mediante raspados de mucosa oral y gingiva, y adicionalmente se realizaron preparados citológicos en laminillas electrocargadas para la realización de la hibridación *in situ*. A pesar de que la prevalecía de FeLV en México es elevada (76% para pruebas serológicas y 89% por PCR), se observó que la mayoría de los felinos domésticos no suelen ser muestreados ya sea para realizar inmunocromatografía (SNAP) o PCR, además de llevar calendarios de vacunación incompletos o sustituyendo el muestreo con la vacunación, sin conocer el estado de salud de los felinos respecto al FeLV ya que el diagnóstico clínico es imposible, la infección subyacente por el retrovirus es pasada por alto.

El diagnóstico por inmunocromatografía detectó un porcentaje menor (12%) de animales positivos a los trabajos previamente descritos. Según Lutz *et al* (2009) la sensibilidad y especificidad de la inmunocromatografía es comparable con la del ELISA, la cual está basada en la identificación de la proteína p27, la cual es un marcador de infección pero no siempre de viremia. Alrededor del 10 % de gatos muestreados que son positivos a la PCR no son reconocidos por el ELISA pues no presentan antigenemia, esta es la principal causa por la cual se pensó en el PCR de mucosa oral, según Autran (2014), el PCR es la técnica más adecuada para el diagnóstico del FeLV, ante las pruebas serológicas, además de que es la prueba más recomendada para aclarar resultados no concluyentes a las pruebas de antígeno p27.

En cuanto a la toma de muestra para la obtención de ADN a partir de células de mucosa oral es mucho más sencilla en animales que presentan enfermedades asociadas al FeLV o con una infección progresiva, ya que Cotter (2008) y Stützer, B. (2010) reportan que la mayoría de las anemias asociadas al FeLV son no regenerativas, causadas por la mielosupresión. Se observó que en pacientes graves estas anemias disminuyen la presión venosa y por consecuencia la dificultad para acceder a una muestra de sangre.

De acuerdo con Hartman (2012) los gatos antígeno-negativo, provirus positivos son frecuentemente detectados, pues el provirus está integrado al genoma del gato, estos gatos no excretan el virus pero la reactivación con excreción del virus es posible, lo cual le da importancia a tener una prueba que pueda detectar ADN proviral integrado en el genoma de las células del gato.

El grupo de estudio fue conformado por una población heterogénea con base en los resultados del SNAP, la signología clínica, estatus de vacunación y los resultados de la citología de mucosa oral permitieron la selección de las muestras para la hibridación *in situ* con la finalidad de obtener resultados positivos.

La hibridación *in situ* no tiene valor diagnóstico para la detección de ADN proviral pues la mucosa oral consta principalmente de células escamosas maduras caracterizadas por ser grandes, planas y de aspecto redondo a ligeramente angular, presentando pequeños núcleos redondos con cromatina densa, algunas pueden ser anucleadas; lo que nos disminuye considerablemente la cantidad de ADN genómico, a pesar de que la longitud de la sonda tiene una influencia relativamente menor, al usarse una sonda más corta (199 pb + 25%) se permitió una mejor penetración por lo tanto aumentó la sensibilidad, siendo de importancia en casos donde existe un número bajo de copias del blanco ^{20, 21, 22, 23}.

Como menciona Brown (1998) una de las desventajas de la HIS es la naturaleza de hidratación prolongada del protocolo, el uso de enzimas y detergentes en la reacción dando como resultado un problema de desprendimiento de las células de las laminillas, aun utilizando laminillas electrocargadas, problema con el cual el estudio se enfrentó pues en numerosas ocasiones tuvieron que disminuirse la cantidad de lavados en las diversas soluciones del protocolo pues se presentaba pérdida parcial o total de la muestra.

Los sistemas de pruebas que se evalúan deben compararse con una referencia, en este estudio el PCR fue elegido como el estándar para la verificación de los resultados de la HIS, se utilizaron los mismos iniciadores para la producción de la sonda. Diversos factores pueden afectar la eficacia de la PCR como son el diseño de iniciadores específicos, la calidad y concentración del ADN blanco y la etapa de la infección en la que se encuentre el gato infectado. Para el diseño de iniciadores se utilizaron como base estudios previos realizados por Autran (2014) y Ramírez, *et al* (2016).

Según un reporte de Richards (2001) no existe un protocolo estandarizado o validado para la identificación de ADN o ARN para el FeLV, en el presente trabajo se utilizó ADN proviral proveniente de células de mucosa oral para realizar la estandarización de la PCR, donde se realizaron curvas de concentración de cloruro de magnesio, templado y gradientes de

temperatura. En cuanto al cloruro de magnesio ($MgCl_2$) es un cofactor necesario para la actividad enzimática de las ADN polimerasas. La concentración óptima debe determinarse empíricamente para cada polimerasa, según los resultados se puede utilizar el kit de Master mix sin adicionar más $MgCl_2$. Para la curva de templado se puede determinar que la PCR de mucosa oral es sensible pues se pudo detectar ADN proviral en muestras de hasta 4 ng/ μ l, a pesar de la calidad y de la concentración obtenida de ADN genómico de mucosa oral de felinos domésticos durante la extracción, se observó una banda en el gel de electroforesis de 200 pb, que coincide con el tamaño esperado (199 pb) del fragmento de env amplificado del FeLV.

Según la patogenia del virus las células de las mucosas son infectadas durante la infección progresiva, haciendo posible detectar animales que son positivos mediante esta técnica. Sin embargo no se descarta la posibilidad de diagnosticar en un bajo número las demás etapas de la enfermedad pues en un inicio la replicación del virus se lleva a cabo en tejido linfóide de orofaringe y en estudios de PCR sensibles el provirus puede encontrarse en tejidos de gatos que presentan una infección abortiva, lo que significa que muy pocos o ningún gato es capaz de eliminar por completo al FeLV de sus células.

En el caso de los gatos con infección regresiva también se puede detectar provirus en muestras de sangre de animales antígeno negativo. Es complicado determinar el verdadero estatus de infección, pero resultados discordantes en gatos deben considerarse una fuente potencial de infección.

Conclusiones

- La HIS no fue de valor diagnóstico para la detección del FeLV en preparados citológicos de mucosa oral de felinos domésticos.
- La cantidad de ADN proviral para ser detectado mediante HIS es insuficiente, se sugiere la utilización de sondas para ARN para la localización topológica de la infección del FeLV en preparados celulares de mucosa oral.
- No se descarta el uso de mucosa oral para el diagnóstico del FeLV, pues la técnica de PCR estandarizada puede detectar concentraciones de 4 ng/ μ l.

Referencias

1. Hardy, W. D., Jr. 1980 Feline leukemia virus diseases. In W. D. Hardy, M. Essex, and A. J. McClelland (ed.), Feline leukemia virus. Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam. 3-31
2. Jarret, O. 1984 Pathogenesis of feline leukaemia virus- related diseases. In J.M. Goldman, and O. Jarrett (ed.), Mechanisms of viral leukemogenesis. Churchill Livingstone Ltd, Edinburgh, 135-154.
3. Neil, J. C., D. Forrest, D. L. Doggett, and J. I. Mullins. 1987. The role of feline leukemia virus in naturally-occurring leukemias. Cancer Surv. 6:117-137.
4. Fujino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2008, Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis, Veterinary immunology and immunopathology 123, 138-143.

5. Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1991. Feline leukemia –virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1287-1297.
6. Gleich, S., Hartmann, K., 2009. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 23, 552-558.
7. Addie, D.D., Demmos, J.M., Toth, S., Callanan, J.J., Reid, S., Jarrett, O., 2000. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet. Rec.* 146. 419-424.
8. Cotter, S.M., 1998. Feline viral neoplasia. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. WB Saunders, Philadelphia, PA.
9. Levy, J.K., 2000. FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. WB Saunders, Philadelphia.
10. Levy, J.K., Scott, H.M., Lachtara, J.L., Crawford, P.C., 2006. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 371-376.
11. Cotter, S.M., 1991. Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199. 1470-1473.
12. Hartmann, K., 2011. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140, 190-201.
13. Flynn, J.N., Dunham, S.P., Watson, V., Jarret, O., 2002. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. *J. Virol.* 76, 2306-2315.
14. Hoover, E. A., Olsen, R. G., Hardy Jr., W.D., Schaller, J.P., Mathes, L.E., 1976. Feline leukemia virus infection: age-related variation in response of cats to experimental infection. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 365-369.
15. Overbaugh, J., Donahue, P.R., Quackenbush, S.L., Hoover, E.A., Mullins, J.I., 1988. Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science* 239, 906–910.
16. Lauring, A.S., Cheng, H.H., Eiden, M.V., Overbaugh, J., 2002. Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. *J. Virol.* 76, 8069–8078.
17. Barnett, A.L., Wensel, D.L., Li, W., Fass, D., Cunningham, J.M., 2003. Structure and mechanism of a coreceptor for infection by a pathogenic feline retrovirus. *J. Virol.* 77, 2717–2729.
18. Quackenbush, S.L., Donahue, P.R., Dean, G.A., Myles, M.H., Ackley, C.D., Cooper, M.D., Mullins, J.I., Hoover, E.A., 1990. Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *J. Virol.* 64, 5465–5474.
19. Hoffmann-Fezer, G., Mortelbauer, W., Hartmann, K., Mysliwicz, J., Thefeld, S., Beer, B., Thum, I., Kraft, W., 1996. Comparison of T-cell subpopulations in cats

- naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res. Vet. Sci.* 61, 222–226.
20. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, De Nicola DB. 2008. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 3rd ed. Canada: Mosby Elsevier.
 21. Raskin R.E., Meyer D.J. 2010. *Canine and Feline Cytology*. Second Edition. Saunders, USA
 22. De Buen, N., 2001. *Citología diagnóstica veterinaria, Manual moderno*, México.
 23. Baker, R., Lumsden, J.H., 2000. *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*, Mosby, Canada.
 24. Linenberger, M.L., Deng, T., 1999. The effects of feline retroviruses on cytokine expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 343–368.
 25. Diehl, L.J., Hoover, E.A., 1992. Early and progressive helper T-cell dysfunction in feline leukemia virus-induced immunodeficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, 1188–1194.
 26. Lutz, H., Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2009. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 565–574.
 27. Pedersen, N.C., 1988. Feline leukemia virus infection. In: Pedersen, N.C. (Ed.), *Feline Infectious Diseases*. American Veterinary Publications, Santa Barbara, CA, p. 83.
 28. Kohn, B., Weingart, C., Eckmann, V., Ottenjann, M., Leibold, W., 2006. Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998–2004). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 159–166.
 29. Anderson, L.J., Jarrett, W.F., 1971. Membranous glomerulonephritis associated with leukaemia in cats. *Res. Vet. Sci.* 12, 179–180.
 30. Brightman 2nd, A.H., Ogilvie, G.K., Tompkins, M., 1991. Ocular disease in FeLV-positive cats: 11 cases (1981–1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 1049–1051.
 31. Pedersen, N.C., 1991. Feline leukemia virus infection. In: Pedersen, N.C. (Ed.), *Feline Husbandry, Disease and Management in the Multiple Cat Environment*. American Veterinary Publications, Goleta, CA, pp. 210–220.
 32. Day, N.K., O'Reilly-Felice, C., Hardy Jr., W.D., Good, R.A., Witkin, S.S., 1980. Circulating immune complexes associated with naturally occurring lymphosarcoma in pet cats. *J. Immunol.* 125, 2363–2366.
 33. Tuomari, D.L., Olsen, R.G., Singh, V.K., Kraut, E.H., 1984. Detection of circulating immune complexes by a Clq/protein A-ELISA during the preneoplastic stages of feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 7, 227–238.
 34. Stützer, B., Muller, F., Majzoub, M., Lutz, H., Greene, C.E., Hermanns, W., Hartmann, K., 2010. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 192–197.
 35. Gleich, S., Hartmann, K., 2009. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virusinfected cats. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 552–558
 36. Brown, M.R., Rogers, K.S., 2001. Neutropenia in dogs and cats: a retrospective study of 261 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 37, 131–139.

37. Lutz, H., Castelli, I., Ehrensperger, F., Pospischil, A., Rosskopf, M., Siegl, G., Grob, M., Martinod, S., 1995. Panleukopenia-like syndrome of FeLV caused by co-infection with FeLV and feline panleukopenia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46, 21–33.
38. Kipar, A., Kremendahl, J., Grant, C.K., von Bothmer, I., Reinacher, M., 2000. Expression of viral proteins in feline leukemia virus-associated enteritis. *Vet. Pathol.* 37, 129–136.
39. Kipar, A., Kremendahl, J., Jackson, M.L., Reinacher, M., 2001. Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis. *Vet. Pathol.* 38, 359–371.
40. Hisasue, M., Nagashima, N., Nishigaki, K., Fukuzawa, I., Ura, S., Katae, H., Tsuchiya, R., Yamada, T., Hasegawa, A., Tsujimoto, H., 2009. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. *Int. J. Cancer* 124, 1133–1141.
41. Tsatsanis, C., Fulton, R., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Levy, L., Terry, A., Spandidos, D., Onions, D., Neil, J.C., 1994. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J. Virol.* 68, 8296–8303.
42. Forman, L.W., Pal-Ghosh, R., Spanjaard, R.A., Faller, D.V., Ghosh, S.K., 2009. Identification of LTR-specific small non-coding RNA in FeLV infected cells. *FEBS Lett.* 583, 1386–1390.
43. Rickard, C.G., Post, J.E., Noronha, F., et al., 1969. A transmissible virus induced lymphocytic leukemia of the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 42, 987–1014.
44. Hardy Jr., W.D., Hirshaut, Y., Hess, P., 1973. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. *Bibl. Haematol.* 39, 778–799.
45. Jarrett, O., Laird, H.M., Hay, D., 1973. Determinants of the host range of feline leukaemia viruses. *J. Gen. Virol.* 20, 169–175.
46. Essex, M., Cotter, S.M., Hardy Jr., W.D., Hess, P., Jarrett, W., Jarrett, O., Mackey, L., Laird, H., Perryman, L., Olsen, R.G., Yohn, D.S., 1975. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. IV. Antibody titers in cats with naturally occurring leukemia, lymphoma, and other diseases. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 463–467.
47. Cotter, S.M., Hardy Jr., W.D., Essex, M., 1975. Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166, 449–454.
48. Jackson, M.L., Haines, D.M., Meric, S.M., Misra, V., 1993. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 57, 269–276.
49. Hardy Jr., W.D., Zuckerman, E.E., MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Essex, M., 1977. A feline leukaemia virus- and sarcoma virus-induced tumour specific antigen. *Nature* 270, 249–251.
50. Neil, J.C., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N.M., Onions, D.E., Lees, G., Jarrett, O., 1984. Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* 308, 814–820.

51. Rojko, J.L., Kociba, G.J., Abkowicz, J.L., Hamilton, K.L., Hardy Jr., W.D., Ihle, J.N., O'Brien, S.J., 1989. Feline lymphomas: immunological and cytochemical characterization. *Cancer Res.* 49, 345–351.
52. Besmer, P., Hardy Jr., W.D., Zuckerman, E.E., Bergold, P., Lederman, L., Snyder Jr., H.W., 1983. The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV. *Nature* 303, 825–828.
53. Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F.H., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder Jr., H.W., Brodeur, D., Zuckerman, E.E., Hardy, W.D., 1986. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 320, 415–421.
54. McDonald, R., Thakkar, B., Wolfe, L.G., Deinhardt, F., 1976. Characteristics of three strains of feline fibrosarcoma virus grown in cat and marmoset monkey cells. *Int. J. Cancer* 17, 396–406.
55. Hartmann, K., 2011. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection, Elsevier, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143, 190-201.
56. Carmichael, K.P., Bienzle, D., McDonnell, J.J., 2002. Feline leukemia virus associated myelopathy in cats. *Vet. Pathol.* 39, 536–545.
57. Fails, A.D., Mitchell, T.W., Rojko, J.L., Whalen, L.R., 1997. An oligopeptide of the feline leukemia virus envelope glycoprotein is associated with morphological changes and calcium dysregulation in neuronal growth cones. *J. Neurovirol.* 3, 179–191
58. Mitchell, T.W., Rojko, J.L., Hartke, J.R., Mihajlov, A.R., Kasameyer, G.A., Gasper, P.W., Whalen, L.R., 1997. FeLV envelope protein (gp70) variable region 5 causes alterations in calcium homeostasis and toxicity of neurons. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 14, 307–320.
59. Angerer, L.M., Angerer, R.C., 1992, *In situ hybridization to cellular RNA with radiolabelled RNA probes: A Practical Approach*, ed. Wilkinson, D.G., Oxford University Press, New York, 5-32.
60. Langer, P.R., Waldrop, A.A., Ward, D.A., 198, Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 6633-6637.1
61. Hölftke, H.J., Kessler, C., 1990, Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG): hybridization and ELISA-based detection, *Nucleic Acids Res*, 18, 5843-5851.
62. Kessler, C., 1991, The digoxigenin system: anti-digoxigenin technology-a survey on the concept and realization of a novel bioanalytic indicator system. *Mol Cell Probes* 5, 161-205.
63. LeMoine, C., Normand, E., Bloch, B., 1995, Use of a non-radioactive probes for mRNA detection by in situ hybridization: interests and applications in the central nervous system. *Cell. Mol. Biol.* 41, 921-923.
64. Wu, T.C., Kanayama, M.D., Hruban, R.H., Au, W.C., Askin, F.B., Hutchins, G.M., 1992, Virus-associated RNAs (VA-I and VA-II): an efficient target for the detection of adenovirus infections by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 140, 991-998.
65. Gandrillon, O., Solari, F., Legrand, C., Jurdic, P., Samarut, J., 1996, A Rapid and convenient method to prepare DIG-labelled RNA probes for use in non-radioactive in situ hybridization. *Mol. Cell. Probes*, 10, 51-55.

66. Young, I.D., Ailles, L. Deugau, K., Kisilevsky, R., 1991. Transcription of cRNA for in situ hybridization from polymerase chain reaction-amplified DNA, Lab. Invest. 64, 709-712.
67. Weiss, L.M., Chen, Y.Y., 1991. Effects of different fixatives on detection of nucleic acids from paraffin-embedded tissues by in situ hybridization using oligonucleotide probes. J. Histochem Cytochem 32, 1237-1342.
68. Haase, A., Brahic, M., Stowring, L., Blum, H., 1984. Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization. Methods in Virology, vol. 2, ed. Maramorosch, Academic Press, New York, 189-226.
69. Tyrrel, L., Elias, J., 1995, Detection of specific mRNAs in routinely processed dermatopathology specimens, Am. J. Dermatopathol, 17, 76-483.
70. Walker, E., Mcnicol, A.M., 1992, In situ hybridization demonstrates the stability of mRNA in post-mortem rat tissues, J. Pathol., 168, 67-73.
71. Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H., Schweizer Ü., 1986, Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen sections under varying fixation and pretreatment conditions, Histochem. J., 18, 271-276.
72. Lu, Q. L., Lawson, P., Thomas J. A., 1995, Criteria for consistent and high sensitivity of DNA in situ hybridization on paraffin sections: optimal proteolytic enzyme digestion, J. Clin. Lab. Anal. 9:285-292.
73. Brown, C., 1998, In Situ Hybridization with Riboprobes: An Overview for Veterinary Pathologists, Vet Pathol., Georgia, 35:159-167
74. Brown, C. C., Meyer, R. F., Grubman, M. J., 1994, Presence of African horse sickness virus in equine tissues, as determined by in situ hybridization. Vet Pathol 31:689-694.
75. Brown, C. C., Rhyan, J. C., Grubman, M. J., Wilbur, L. A., 1996, Distribution of bluetongue virus in tissues of experimentally infected pregnant dogs as determined by in situ hybridization. Vet Pathol 33:337-340.
76. Casey, J., Davidson, N., 1977, Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucleic Acids Res 4:1539-1552.
77. Desport, M., Collins, M. E., Brownlie, J., 1994, Detection of bovine virus diarrhea virus RNA by in situ hybridization with digoxigenin-labelled riboprobes. Intervirology 37:269-276.
78. Poulet, R. M., Vogt, V. M., Bowser, P. R., Casey, J. W., 1995, In situ hybridization and immunohistochemical study of walleye dermal sarcoma virus (WDSV) nucleic acids and protein in spontaneous sarcoma of adult walleyes (*Stizostedion vitreum*). Vet Pathol 32:162-172.
79. Ohmura, Y., Ono, E., Matsuura, T., Kida, H., Shimizu, Y., 1993, Detection of feline herpesvirus1 transcripts in trigeminal ganglia of latently infected cats. Arch Virol 129:341-347.
80. Hardy, W. D. J., 1991, General principles of retrovirus immunodetection tests. Journal of the American Veterinary Medical Association 199, 1282-1287
81. Hardy, W. D. J., Hirshaut, Y., Hess, P., 1973, Detection of the feline leukaemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. In: Unifying Concepts of Leukemia. Dutcher RM, Chieco-Bianchi L (eds). New york, Karger and Basel, pp. 778-799
82. Hardy, W. D., Zuckerman, E. E., 1991, Ten year study comparing enzyme-linked immunosorbent assays with the immunofluorescent antibody test for the detection of

- feline leukemia virus infection in cats. Journal of the American Veterinary Medical Association 199, 1365–1373
83. Hardy, W. D. J., Zuckerman, E. E., 1991, Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. Journal of the American Veterinary Medical Association 199, 1327–1334
 84. Sparkes, A. H., 2002, Feline leukemia virus and vaccination, Proceedings of the ESFM Feline Congress, Stockholm, Elsevier.
 85. Hartmann, K., Griessmayr, P., Schulz, B., Greene, C. E., Vidyashankar, A. N., Jarret, O., Egberink, H., 2007, Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection, J. Fel. Med. 9, 493-445.
 86. Chávez, A., Buentello, B., Ocharán, M. E., Calzada, C. C., Flores, A., Baptista, H. A., Estrada, H., 2016, Desing of a protocol for obtaining genomic DNA from saliva using mouth wash: Samples taken from patients with periodontal disease, Journal of Oral Biology and Craneofacial Research 6:129-134.
 87. Dean, R. S., Helps, C. R., Gruffydd Jones, T. J., Tasker, S., 2008, Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats, J. Fel. Med. Surg. 10:413-417.
 88. Hartmann, K., 2012, Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review, Journal Viruses, Germany, 4: 2684-2710.
 89. Cotter, S.M., 1979, Anemia associated with feline leukemia virus infection, J. Am. Vet. Med. Assoc., 175:1191–1194.
 90. Cheng H, E.A., 2006, Envelope Determinants for Dual-Receptor Specificity in Feline Leukemia Virus Subgroup A and T Variants. Journal of Virology. 80, (4): 1619-1628.
 91. Chhetri, B.K., Berke, O., Pearl, L.D., Bienzle, D., 2013, Comparison of the geographical distribution of FIV and FeLV infections in the USA (2000 – 2011). BMC Veterinay Research. 9:12.
 92. Coelho, F.M., Bomfim, M.R., De Andrade, F., Ribeiro, N.A., Luppi, M.M., Costa, E.A., Oliveira, M.E., Da Fonseca, F.G., ReIsende, M., 2008, Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. Journal of General Virology. 89: 2799-2805.
 93. Greene, C. E., 1993, Enfermedades infecciosas del perro y el gato, Tercera edición, Intermedica, República Argentina.
 94. Ramírez, H., Autran, M., García, M. M., Carmona, M. Á., Rodríguez, C., et Martínez, H. A., 2016, Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. Archives of Virology, 161, 1039-1045.
 95. Roca, A., 2004, Genomically intact endogenous feline leukimia viruses of recent origin. Journal of Virology 78, (8):4370-5.
 96. Cattori, V., Tandon, R., Pepi, A., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006, Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA, Mol. Cell Probes 20, 172-181.
 97. Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lemann, R., Little, S., Sundahl, E., Thayer, V., 2008, American asspcoation of deline practitioners feline retrovirus management guidelines, J. Fel. Med. Surg, 10, 300-316.

98. Major, A., Cattori, V., Boenzli, E., Riond, B., Ossent, P., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., 2010, Exposure of cats to low doses of FeLV: Seroconversion as the sole parameter of infection, *Vet. Res.*, 41, 17.
99. Hofmann-Lehmann, R., Huder, J. B., Gruber, S., Boretti, F., Sigrist, B., Lutz, H., 2001, Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats, *J. Gen. Virol.*, 82, 1589-1596.
100. Pepin, A. C., Tandon, R., Cattori, V., Niederer, E., Riond, B., Willi, B., Lutz, H., Hoffmann-Lehmann, R., 2007, Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral rna in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats, *Virus Res.*, 127, 9-16.
101. Torres, A. N., Mathiason, C. K., Hoover, E. A., 2005, Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time pcr, *Virology*, 332, 272-283.
102. Ghosh, S.K., Faller, D.V., 1999, Feline leukemia virus long terminal repeat activates collagenase IV gene expression through AP-1. *J. Virol.* 73, 4931-4940.
103. Ghosh, S.K., Roy-Burman, P., Faller, D.V., 2000. Long terminal repeat regions from exogenous but not endogenous feline leukemia viruses transactivate cellular gene expression. *J. Virol.* 74, 9742-9748.
104. Kumar, D. V., Berry, B. T., Roy-Burman, P., 1989, Nucleotide Sequence and Distinctive Characteristics of the env Gene of Endogenous Feline Leukemia Provirus, *Journal of Virology, California*, 2379-2384.
105. Hellard, E., Fouchet, D., Santin-Janin, H., Tarin, B., Badol, V., Coupier, C., 2011, When cats' ways of life interact with their viruses: A study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*), *Preventive Veterinary Medicine, France*, 101, 250-264
106. Autran, M. 2014, Uso de la técnica de PCR para confirmar el diagnóstico de leucemia viral felina y el análisis filogenético de los productos amplificados, Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
107. Pandey, R., Ghosh, A. K., Kumar, D. V., Bachman, B. A., Shibata, D., Roy-Burman, P., 1991, Recombination between Feline Leukemia Virus Subgroup B or C and Endogenous *env* Elements Alters the In Vitro Biological Activities of the Viruses, *Journal of Virology, California*, 6495-6508.

ANEXO

N°	Nombre	Sexo	Edad	Historia clínica	SNAP	Citología	HIS
1.	Negrís	Macho	1 año	Hematuria, hiporexia, dolor abdominal, gingivostomatitis	Positivo	Inflamación supurativa séptica	Sin señal
2.	Napolitana	Hembra		Descementocele, uveitis	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
3.	Sky	Macho	1 año 1 mes	Sin vacunas, depresión, anorexia, mucosas pálidas, líquido abdominal, gingivostomatitis	Positivo	Inflamación supurativa séptica	Sin señal
4.	Tina	Hembra	2 años	Sin vacunas	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
5.	Misifu	Hembra	-	-	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
6.	Nieves	Hembra	5 años	Sin vacunas, gingivitis, estornudos, dipilidiasis.	Positivo	Gingivitis supurativa séptica	Sin señal
7.	Cucho	Macho	3 años	Gingivostomatitis, tercer parpado protruido	Positivo	Gingivitis supurativa séptica	Sin señal
8.	Churchs	Macho	3 años	Rescatado, ptialismo, baja de peso, anorexia, mucosas pálidas	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
9.	Imori	Hembra	3 años	Expuesto a felino positivo a FeLV	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
10.	Güero	Macho	9 años	Sin vacunas, gingivitis, hiporexia, paresia, vejiga fácil vaciamiento	Positivo	Gingivitis supurativa séptica	Sin señal
11.	Mía	Hembra	4 años	Gingivitis, tercer parpado protruido, vacuna rabia	Positivo	Gingivitis supurativa séptica	Sin señal
12.	Nieves 2	Hembra	3 meses	Protrusión del tercer parpado, sin vacunas, linfadenomegalia retromandibular, gingivitis, RT positivo	Positivo	Inflamación supurativa séptica	Sin señal

13.	Cocoa	Hembra	1 año 6 meses	Sin vacunas	Positivo	Sin alteraciones	Sin señal
14.	Lyon	Macho	-	Linfadenomegalia generalizada	Positivo	Gingivitis supurativa aseptica	Sin señal
15.	Felipe	Macho	-	-	Positivo	Gingivitis supurativa septica	Sin señal
16.	Copito	Macho	4 meses	Dermatofitosis	Positivo a PCR (oral)	Sin alteraciones	Sin señal
17.	Sin nombre	hembra	1 año	Depresión mucosas pálidas	Positivo a PCR (oral)	Sin alteraciones	Sin señal