

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

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE SANGUE, MEDULA ÓSSEA E
LINFONODO DE GATOS ASSINTOMÁTICOS INFECTADOS PELO VÍRUS
DA LEUCEMIA FELINA**

MARIANA DE PÁDUA COSTA

Belo Horizonte, MG

2022

MARIANA DE PÁDUA COSTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICO-LABORATORIAL DE SANGUE, MEDULA ÓSSEA E
LINFONODO DE GATOS ASSINTOMÁTICOS INFECTADOS PELO VÍRUS
DA LEUCEMIA FELINA**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientador: Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

Co-orientadores: Prof. Rodrigo dos Santos Horta
Prof. Felipe Pierezan

Belo Horizonte, MG

2022

C838a Costa, Mariana de Pádua, 1985-
Avaliação clínico – laboratorial de sangue, medula óssea e linfonodo de gatos assintomáticos infectado pelo vírus da leucemia felina / Mariana de Pádua Costa . – 2022.
93 f.:il.

Orientador: Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.
Bibliografia: f. 76 a 90.

1. Gato - Doenças - Teses - 2. Linfoma - Teses - 3. Citologia – Teses – I. Paes, Paulo Ricardo de Oliveira – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA DE PÁDUA COSTA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a) Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a) Rubens Antonio Carneiro

Dr.(a) Marília Martins Melo

Dr.(a) Leandro Abreu da Fonseca

Dr.(a) Regina Kiomi Takahira



Documento assinado eletronicamente por Paulo Ricardo de Oliveira Paes, Professor do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior, em 25/02/2022, às 21:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Regina Kiomi Takahira, Usuário Externo, em 26/02/2022, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leandro Abreu da Fonseca, Usuário Externo, em 28/02/2022, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_acesso_externo=0, informando o código verificador 1266221 e o código CRC 380AD002.

DEDICATÓRIA

Para Susie, obrigada por tanto.

Te amo para sempre!!!

AGRADECIMENTOS

Não tinha como começar diferente. Agradeço a Susie, que foi a minha filha canina e que participou de cada etapa da minha vida em 13 anos. Te amo pra sempre minha tutuca!!!

Ao Daniel por me mostrar o que é sentir o maior amor do mundo e por me amar independente de qualquer coisa. Cada dia te amo mais!!!

Ao Rodrigo por todo o companheirismo, amor e amizade, além de toda a orientação e trabalho árduo durante todo o experimento e escrita. Suas noites com o Dani agora vão ter mais uma participante. Você foi essencial em todo o processo. Obrigada por ser o melhor pai do mundo e meu maior amor!!!! Tenho muito orgulho da gente!!

Minha mãe, meu maior exemplo e que sempre foi muito forte e nossa referência. Não seria nada sem ela.

A minha irmã Carla por todo o amor e melhores conselhos da vida!!!! Aprendo todos os dias com ela, além de ter me dado um dos meus maiores amores, Luca eu te amo!! Agradeço também ao Faria pela disposição e pelo carinho.

Ao meu irmão por sempre apoiar e mostrar nossas semelhanças, além de também ter me dado o melhor gosto musical!!!

A Helena, por ser doce e por todo o carinho, te amo minha florzinha.

Ao meu pai por todos os conselhos e conversas, além de me mostrar os melhores caminhos.

Ao professor Paulo, que é mais que um orientador há muito tempo! Obrigada por tudo e por toda a confiança depositada em mim

À professora Fabíola, por todo o conhecimento e conselhos nas horas de maior dificuldade e pela parceria de sempre!

Ao Nathan, pela compreensão nas minhas ausências, pelas risadas e amizade!!!!

À Bruna, Isabella, Tâmara, Camila, Pedro e Katharina, obrigada pelo auxílio nos momentos em que mais precisei! Podem contar comigo também.

Ao professor Rodolfo, Reysla, Hellen e Augusto que tiveram o árduo trabalho de me ensinar do zero uma técnica complexa e desafiadora. O trabalho ficou muito melhor com a ajuda de vocês.

Ao professor Jenner, Cláudia e Gabi, obrigada pela boa vontade e disposição em me ajudar sempre e de fazerem me sentir em casa!

Obrigada à Bichos Gerais pela abertura e intensidade do trabalho, admiro muito o trabalho de vocês, especialmente do Gilson e da Júlia, contem sempre comigo!!!!

Agradeço também aos animais utilizados nesse experimento, eles são a razão de tudo e é nossa obrigação cuidar e amar eles independente de qualquer coisa, temos muito a aprender com eles!

À todos os meus amigos vets ou não, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!!! Amo vocês!! À todos que me ajudaram nesses anos principalmente à Val e à Conceição.

Às minhas avós Olga (saúde sempre) e Maria Aparecida, não tenho palavras para descrever a importância delas na minha vida.

Ao Marques, meu primeiro grande amor canino, me ensinou a intensidade do amor e da perda.

Aos meus novos amores Milo e Logan, que completam a nossa família.

E para finalizar agradeço a Deus e todas as energias do universo que me ajudaram, e que me fizeram amadurecer e aprender todos os dias. Estamos aqui para evoluir!!

EPIGRAFE

**“A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo da busca.**

**E ensinar e aprender não pode dar-se fora
da procura, da boniteza e da alegria.”**

Paulo Freire

RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é o retrovírus mais patogênico para o gato doméstico e está relacionado ao desenvolvimento de anormalidades genéticas, neoplasias e imunossupressão. Após a infecção, os pacientes podem evoluir para as formas abortiva, focal, regressiva ou progressiva da doença. Os gatos na forma progressiva apresentam antigenemia persistente e estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de alterações clínicas relacionadas ao FeLV. Atualmente, apesar da maior compreensão da patogenia do FeLV, ainda existem dúvidas sobre as alterações laboratoriais provocadas pelo vírus em pacientes com infecções progressiva ou regressiva. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações clínicas e laboratoriais em gatos com diferentes *status* de infecção pelo FeLV, obtido com os testes antigênico e PCR. Na população avaliada, a prevalência do FeLV foi de 20,4% (10/49), sendo 40% (4/10) na forma regressiva e 60% (6/10) na forma progressiva da doença. Não foi observada diferença estatística entre as variáveis do leucograma, plaquetograma e mielograma dos animais positivos e negativos, enquanto no eritrograma foi observada maior mediana no VCM (35,6 vs. 31,8; Mann-Whitney, $p = 0,0046$) e menor média no CHCM (33,3 vs. 36,0; “t” de student, $p = 0,00192$) dos animais positivos. A mediana da relação de linfócitos CD4+/CD8+ foi de 2,10 para animais negativos para a infecção, e 2,04 para os positivos (2,24 para regressores e 1,87 para progressores), com $p = 0,7438$ (Kruskall-Wallis *ad-hoc* Dunns). A partir da citometria de fluxo observou-se maior concentração de monócitos no sangue nos gatos com antigenemia persistente para o FeLV (2,48%) em comparação àqueles na forma regressiva da doença (0,69%) ou negativos (0,73%), com $p = 0,0204$ (ANOVA *ad-hoc* Tukey). Não houve diferença na relação de linfócitos CD4+/CD8+ conforme o status FeLV.

Palavras-chave: Retrovírus, medula óssea, hematologia, citologia, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The feline leukemia virus (FeLV) is the most pathogenic retrovirus for the domestic cat, related to the development of genetic abnormalities, neoplasms and immunosuppression. After infection, patients can evolve to the abortive, atypical, regressive or progressive form of the disease. Cats in the progressive form have persistent antigenaemia and are more susceptible to the development of clinical changes related to FeLV. Despite the better understanding of the pathogenesis of FeLV, there are still concerns about the laboratory abnormalities induced by the virus in patients with progressive or regressive infection. The present study aims to evaluate clinical and laboratory abnormalities in cats according to the FeLV status, determined by antigenic the test and PCR. The prevalence of FeLV in the population was 20.4% (10/49), with 40% (4/10) in the regressive form and 60% (6/10) in the progressive form of the disease. Animals considered positive for FeLV (regressive and progressive infection) had a lower mean and higher median than FeLV-negative cats for CHCM (33.29 vs. 35.96; student “t”, $p = 0.00192$) and MCV (35.60 vs. 31.81; Mann-Whitney, $p = 0.0046$), respectively. There was no difference in the concentration of lymphocytes in the bone marrow of cats according to the infection status. However, there was a reduction in the myeloid:erythroid ratio and an increase in the blast count, with a moderate correlation between the increase in rubriblasts and myeloblasts, in relation to the current literature, even in healthy cats, negative for FeLV. The CD4+/CD8+ lymphocyte ratio median was 2.096 for animals negative for the infection, and 2.044 for positive ones (2.237 for regressors and 1.871 for progressives), with $p = 0.7438$ (Kruskall-Wallis *ad-hoc* Dunns). From the flow cytometry, a higher concentration of monocytes in the blood was observed in cats with persistent antigenaemia for FeLV (2.48%) compared to those in the regressive form of the disease (0.69%) or negative (0.73%), with $p = 0.0204$ (*Ad-hoc* Tukey ANOVA). There was no difference in CD4+/CD8+ ratio according to FeLV status.

Key-words: Retrovírus, bone marrow, haematology, cytology, flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Imunofenotipagem de leucócitos em sangue representando média e desvio-padrão de gatos dos grupos negativo, regressores e progressores. (A) Média e desvio-padrão de cada grupo do total de linfócitos marcados no “gate”. (B) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD4. (C) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD8. (D) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD21. (E) Média e desvio-padrão de cada grupo dos monócitos marcados para CD14. **60**
- Figura 2** Imunofenotipagem de linfócitos em linfonodo representando média e desvio-padrão de gatos dos grupos negativo, regressores e progressores. (A) Média e desvio-padrão de cada grupo do total de linfócitos marcados no “gate”. (B) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD4. (C) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD8. (D) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD21. **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise estatística significativa comparando gatos dos grupos negativo e positivo (regressores somados aos progressores) em relação à infecção por FeLV.	53
Tabela 2	Média, mediana e desvio padrão dos resultados do perfil bioquímico de gatos de grupo negativos, regressores e progressores para FeLV.	55
Tabela 3	Valores de mediana, média e desvio padrão do eritrograma de gatos negativos e infectados de forma regressiva e progressiva pelo FeLV.	56
Tabela 4	Valores de mediana, média e desvio padrão do leucograma dos gatos dos grupos negativo, regressor e progressor para FeLV.	57
Tabela 5	Valores de mediana, média e desvio padrão de imunofenotipagem em sangue de gatos de grupos negativo, regressor e progressor para infecção por FeLV.	59
Tabela 6	Valores de média e desvio padrão de parâmetros observados no mielograma dos grupos negativos, regressores e progressores para infecções pelo FeLV.	62
Tabela 7	Valores de mediana, média e desvio padrão de porcentagem de células diferenciadas em lâmina de linfonodo dos gatos dos grupos de animias negativos, regressores e progressores para FeLV.	64
Tabela 8	Valores de mediana, média e desvio padrão de imunofenotipagem em linfonodo de gatos de grupos negativo, regressor e progressor para infecção por FeLV.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Avaliação dos resultados para testes diagnósticos do FeLV relacionando com as fases da infecção.	32
Quadro 2	Anticorpos utilizados e a respectiva célula marcada na reação.	50
Quadro 3	Frequência de alterações morfológicas em leucócitos de gatos pertencentes a cada grupo estudado para infecção pelo FeLV.	57

LISTA DE ABREVIACÕES

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

CHCM –concentração de Hemoglobina Corpuscular média

DNA–ácido desoxirribonucleico

DNase - deoxirribonuclease

dNTP – desoxirribonucleotideos fosfatados

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

ERV-DC –vírus endógeno do gato doméstico

FA– fosfatase alcalina

FeLV – *felineleukaemia vírus* (vírus da leucemia felina).

FIV – vírus da imunodeficiência felina

FOCMA – *felineoncornavirus-associatedcellmembraneantigen*(antígeno de membrana celular associada ao oncornavírus felino).

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCM – hemoglobina corpuscular média

IFA –imunocromatografia direta

M:E –relação mielóide: eritróide

RDW – amplitude de distribuição dos eritrócitos

RPM – rotações por minuto

SMD –síndrome mielodisplásica

VG –volume globular

PBS– salina tamponada com fosfato

PCR –*polymerasechainreaction*

RNA – ácido ribonucléico

VCM– volume corpuscular médio

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	8
1.INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 FeLV.....	17
2.1.1 Aspectos de microbiologia.....	17
2.1.2 Patogenia.....	18
2.1.3 Apresentações e sintomatologia clínica	21
2.2 Diagnóstico do FeLV	26
2.2.1 Métodos de detecção do antígeno viral.....	26
2.2.2 Métodos de detecção viral	28
2.2.3 Métodos de detecção de anticorpos	31
2.2.4 Interferência dos tipos de infecção pelo FeLV no diagnóstico.....	31
2.2.5 Utilização dos testes na rotina clínica	32
2.3 Medula óssea em gatos infectados pelo FeLV	33
2.3.1 Aspectos gerais da ação do FeLV na medula ósea	33
2.3.2 Avaliação da medula óssea	36
2.3.3 Desordens mieloproliferativas	38
2.3.4 Anemia.....	41
2.3.5 Alterações em plaquetas	43
2.3.6 Alterações em leucócitos	43
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	44
3.1 Hipótese	44
3.2 Objetivo geral.....	44
3.3 Objetivos específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Seleção dos animais	44
4.2 Exame clínico.....	45
4.3 Sedação e anestesia	45
4.4 Coleta	46
4.5 Processamento das amostras	46
4.5.1 Diagnóstico do <i>status</i> da infecção pelo FeLV	46
4.5.2 Hemograma.....	48
4.5.3 Perfil bioquímico	49

4.5.4 Avaliação citológica da medula óssea (mielograma).....	49
4.5.5 Avaliação citológica do linfonodo	49
4.5.6 Avaliação do perfil fenotípico	49
4.5.7 Delineamento experimental e estatística.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Perfil bioquímico	53
5.2 Hemograma.....	55
5.3 Mielograma.....	61
5.4 Avaliação citológica e imunofenotípica dos linfonodos.....	63
6. DISCUSSÃO	67
6.1 Perfil Bioquímico.....	68
6.2 Hemograma.....	70
6.3 Mielograma.....	72
6.4 Citologia linfonodo	74
6.5 Imunofenotipagem de sangue e linfonodo.....	74
7. CONCLUSÕES.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	91
Anexo 1 – Certificado da Comissão de Ética No Uso de Animais (CEUA).....	91
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	92

1. INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina (FeLV) se destaca dentre os retrovírus que acometem o gato doméstico. É considerado o mais patogênico, estando intimamente relacionado ao desenvolvimento de anormalidades genéticas, neoplasias e imunossupressão (O'Connor et al. 1991; Levy et al., 2006; Hartmann, 2012a).

O FeLV apresenta distribuição mundial, mas as prevalências são altamente variáveis nas diferentes regiões geográficas. Nos Estados Unidos e Europa, observou-se redução da prevalência, a partir da década de 1970, pela instituição de programas de diagnóstico, manejo, segregação e eutanásia de animais positivos, mas também com o advento da vacinação (Levy et al., 2008). No Brasil, a ocorrência do diagnóstico da FeLV permanece alta, variando de acordo com a metodologia utilizada para o diagnóstico e a população e região estudadas (Teixeira et al., 2007; Almeida, 2009; Coelho, 2011; Figueiredo e Araújo, 2011). Em gatos atendidos em serviços veterinários na cidade de São Paulo, e submetidos ao teste imunoenzimático (Dya System), observou-se uma prevalência de 12,7% de infecção pelo FeLV (Reche Jr. et al., 1997). No Rio de Janeiro, em gatos de abrigos, domicílios e atendimentos veterinários; 11,5% foram reagentes no teste de imunofluorescência indireta (Almeida, 2009). Já em Belo Horizonte, foi observada positividade no PCR de 32,5% em gatos de abrigo (Teixeira et al., 2007) e de 47,5% em gatos atendidos em serviços veterinários (Coelho et al., 2011).

A transmissão do FeLV ocorre por via horizontal principalmente através da saliva e, apesar de não sobreviver por mais de duas horas no ambiente, o contato com animais virêmicos, mesmo sem sintomatologia clínica da doença, é um grande risco para a infecção (Rojko e Olsen, 1994). O contato íntimo entre os animais, compartilhamento de vasilhas para alimentação e água, brigas e lambeduras são formas efetivas de transmissão horizontal. O contato com urina e fezes de animais infectados, apesar de apresentarem menor concentração de partículas virais, também é uma forma de transmissão (Hartmann, 2012). O vírus da FeLV pode ser transmitido, ainda, de forma vertical e por via iatrogênica por isso todos os animais devem ser testados, e imunizados, inclusive aqueles que não tem contato com outros animais e nem acesso à rua (Cotter, 1998). Dentre os fatores de risco estão a idade, sendo os filhotes mais propensos a desenvolver a doença,

densidade populacional, acesso à rua e deficiência na higiene do local onde o felino é mantido (Levy et al., 2008).

Após a infecção pelo FeLV, os gatos podem evoluir para quatro formas distintas: abortiva, regressiva, progressiva e focal (Figueiredo e Araújo Jr., 2011). A determinação da forma em que o animal irá lidar com a apresentação viral irá depender do seu estado imunológico, presença de condições de risco e evolução da doença (Hartmann, 2012; Figueiredo e Araújo Jr., 2011; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020).

A forma mais comum é a regressiva, que ocorre em 60% dos casos. Nesta forma, o antígeno viral não pode ser identificado no sangue ou medula óssea, mas o vírus está presente como DNA proviral nas células progenitoras da medula óssea, podendo haver reversão para a forma progressiva em casos de imunossupressão (Levy et al., 2008; Hartmann, 2012). A forma progressiva, que ocorre em 30 a 40% dos casos, é caracterizada por viremia ou antigenemia persistente, com infecção ativa, sendo mais provável o desenvolvimento de quadros clínicos associados à infecção, bem como a transmissão (Levy et al., 2008; Hartmann, 2012).

Já na infecção focal ou atípica, que representa aproximadamente 10% dos casos de FeLV, o vírus permanece confinado em um determinado órgão, como bexiga, baço e fígado (Hartmann, 2015). Por último, a forma abortiva, em que o vírus é completamente eliminado, infelizmente é rara (Levy et al., 2008; Hartmann, 2012).

O diagnóstico do FeLV geralmente é obtido utilizando-se testes rápidos ELISA, que detectam a proteína p27 do antígeno presente no capsídeo do vírus. Neste teste, o resultado positivo é encontrado apenas em animais em viremia, e ocorre através do uso de sangue total, soro, plasma e secreções salivares de animais na fase progressiva ou inicial da doença (Willet e Hosie, 2013). Como forma de diferenciar viremias persistentes de transitórias (que podem se tornar regressivas) ou infecções recentes que cursaram para infecções abortivas ou persistentes, o teste pode ser repetido de quatro a oito semanas após a positividade do primeiro teste (Mehl, 2001).

Em animais no estágio regressivo da doença, os testes que detectam a proteína p27 apresentam resultados negativos, sendo necessário realizar o diagnóstico através de técnicas de PCR da medula óssea e/ou sangue, detectando o DNA do provírus incorporado nas células tronco da medula óssea do animal ou em leucócitos (Hartman et al., 2001; Hoffman-Lehmann, et al., 2006).

Frequentemente são encontradas alterações hematológicas em gatos infectados pelo FeLV, principalmente nas infecções progressivas, devido tanto aos distúrbios hematopoiéticos, genéticos e imunológicos causados pelo vírus, quanto por alterações que doenças concomitantes e oportunistas podem causar (Hartman, 2012a). A maior parte das alterações hematológicas relacionadas ao FeLV são as citopenias, como anemia, neutropenia, linfopenia, trombocitopenia e, em alguns casos, panleucopenia (Hagiwara et al., 1997; Gleich e Hartmann, 2009), que podem estar associadas a distúrbios medulares graves, que incluem as desordens mieloproliferativas, como as leucemias e mielodisplasias (Gleich e Hartmann, 2009).

A patogenia do FeLV na medula óssea geralmente ocorre em felinos com infecções progressivas, onde há viremia com replicação constante do vírus. Entretanto, animais com infecção regressiva, com a presença do DNA proviral em células da medula óssea, podem apresentar alterações no ambiente medular, com a inativação de genes e alteração na sua expressão, além das possíveis alterações nas funções das células que contém o provírus em seu DNA (Stutzer et al., 2011). Também podem ocorrer alterações nas apresentações de antígenos das células desencadeando destruição imunomediada dos componentes da medula óssea (Hartmann, 2012).

Apesar da melhor compreensão da infecção pelo FeLV e das formas distintas que ocorrem nos pacientes, dependendo da carga viral infectante e sistema imune, as alterações da medula óssea, e imunofenotipagem associadas ao FeLV, encontram-se pobremente caracterizadas, o que resulta em dificuldades na interpretação dos achados clínicos e de patologia clínica, e adequada conduta do paciente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FeLV

2.1.1 Aspectos de microbiologia

O FeLV pertence à família Retroviridae, subfamília oncovirinae e gênero Gammaretrovirus. É um vírus envelopado, constituído de RNA de fita simples e através da polimerase viral transcriptase reversa é formado o provírus que se incorpora ao DNA celular, o que caracteriza a persistência da infecção (Jarrett, 1999). A replicação do FeLV ocorre em diversos tecidos, como medula óssea, glândulas salivares e epitélio respiratório (Hartmann, 2012).

A maioria dos gatos domésticos possuem em seu genoma um retrovírus de FeLV endógeno, o enFeLV. Há teorias de que o enFeLV possa ter se originado da predação de ratos, milhares de anos atrás que possuíam o vírus da leucemia murina (MuLV), que se incorporou nas células dos felinos e foi passado de geração para geração (Polani et al., 2010). O enFeLV não apresenta patogenicidade, mas pode, através de recombinações, influenciar na expressão do FeLV e na formação dos seus subtipos, o que determina a sua patogênese (Roy-burman, 1995). A carga do enFeLV pode estar relacionado com a capacidade de resposta do organismo ao FeLV transmissível. Entretanto, os resultados são contraditórios, já que estudos apontam que uma carga maior do enFeLV pode resultar em infecções mais brandas ou mais graves (Tandom et al., 2008; Kawasaki et al., 2018; Powers et al., 2018).

Foram determinados até o momento seis subtipos de FeLV: A, B, C, D, T e TG35; que são formados a partir de mutações e recombinações, sendo que os subtipos A, B e C os mais prevalentes. Os subtipos se diferenciam por meio das sequências de nucleotídeos da região N-terminal da glicoproteína de superfície e por sua patogenia (Miyazawa, 2002; Anai et al., 2012; Willett e Hosie, 2013; Mikaye et al., 2016). O FeLV-A, onipresente, é o único transmitido horizontalmente entre os animais. A partir dele ocorrem as reações necessárias para a formação dos outros subtipos, sendo ele o mais distante geneticamente do enFeLV (Chiu et al., 2018; Miyazawa, 2002).

A recombinação genética do FeLV-A com a região *env* do enFeLV, ou seja, com sequências retrovirais endógenas, origina o FeLV-B. A formação do FeLV-C ocorre quando há mutações no gene *env* do FeLV-A. Essas mutações ocorrem no sítio de ligação do receptor codificando proteína diferente no envoltório do FeLV-C, alterando assim receptores e proteínas transportadoras (Rigby et al., 1992; Verbrat et al., 1983; Quingley et al., 2000). O FeLV-T é formado quando ocorrem alterações específicas em aminoácidos e uma inserção na proteína do envelope do FeLV-A (Cheng et al., 2007). Mais dois subgrupos foram descobertos, mas ainda não existem estudos específicos sobre as diferenças nas patogenicidades, eles são o FeLV-D e o FeLV-TG35. O FeLV-D é formado a partir de um retrovírus endógeno, não enFeLV, o retrovírus endógeno do gato doméstico *ERV-DC* (do inglês, *endogenous retrovirus-domestic cat*) (Ito et al., 2013). No Japão foi identificado o FeLV-TG35 em um animal, sendo formado a partir de substituições e inserções de aminoácidos no gene *env* do FeLV-A (Mikaye, 2016).

Os subgrupos do FeLV são receptores-específicos e apresentam geralmente patogenicidades distintas, mas apresentam uma resposta imunológica similar no organismo, por isso anticorpos produzidos contra o FeLV-A também agem nos outros subtipos (Hartmann, 2012a). O subtipo FeLV-A, o único transmissível de animal para animal, é o menos patogênico quando encontrado isoladamente (Hartmann, 2012). Quando o subtipo A está combinado com os subtipos B ou C há um aumentada patogenicidade e gravidade da doença (Rojko e Hardy, 1994). Um fator importante para a determinação da maior patogenicidade desses subtipos é a alteração nas proteínas do envelope viral, mas esse mecanismo ainda não é bem definido (Moser et al., 1998).

2.1.2 Patogenia

Existem altas cargas virais na saliva de animais infectados pelo FeLV e com viremia ativa, com os microrganismos também sendo encontrados nas fezes, urina e leite, sendo possível ainda a transmissão vertical. O vírus sobrevive pouco tempo no ambiente, iniciando sua replicação a partir do contato com a mucosa (Cattori et al., 2009).

A partir do contato com o animal, o vírus se replica em células mononucleares do tecido linfóide da região orofaríngea para, posteriormente, atingir órgãos linfóides, onde os monócitos e linfócitos infectados dão início à primeira viremia (Cattori et al., 2008). O provírus contém regiões de repetições gênicas que regulam a atividade e controlam a expressão gênica, dentre elas os genes gag, env e pol, que atuam diretamente no tropismo do vírus e na sua patogenicidade. O gene env codifica as proteínas gp70 e p15E, sendo a primeira a responsável pela adsorção do vírion à célula hospedeira e o alvo da produção de anticorpos pelo animal acometido. O curso da doença varia de acordo com a capacidade imunológica do hospedeiro, podendo evoluir para infecção abortiva, regressiva, progressiva ou focal.

A rara infecção abortiva ocorre em animais imunocompetentes que, apesar de permitir a replicação inicial do vírus na traquéia e tecidos linfóides, conseguem desenvolver uma resposta imune competente eficaz que permite a completa eliminação do vírus (Baar, 1998; Couto, 1994). Portanto, em animais imunocompetentes o vírus pode ser debelado sem replicação em outros locais e, assim, a infecção permanece indetectável, caracterizando uma infecção abortiva (Hartmann, 2012a). Além da imunocompetência, alguns estudos indicam que a infecção abortiva é mais provável em animais expostos a uma carga viral reduzida (Major et. al, 2010; Hartmann, 2012; Figueiredo e Araújo Jr., 2011). Nestes animais, o antígeno e DNA proviral não são detectados nas amostras de sangue/medula óssea/saliva, mas pode-se verificar altos níveis de anticorpos (Hartmann, 2012a).

A infecção regressiva, que ocorre em até 60% dos casos, caracteriza-se pela replicação viral nas células mononucleares da medula óssea e outros órgãos, mas que é interrompida de três a seis semanas após o contato (Hartman, 2012; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020). A replicação viral na medula óssea ocorre através da transcrição reversa do RNA viral, originando o DNA proviral que se integra ao DNA da célula infectada, isto é, o DNA proviral é integrado ao genoma de células hematopoiéticas. O provírus permanece nas células tronco mesmo após a interrupção da viremia, mas não há a presença do antígeno nas outras células do animal, nem a transmissão para outros animais, embora o animal possa apresentar altos níveis de anticorpos (Jarrett, 1999; Westman et al., 2019).

A correlação entre a infecção regressiva do FeLV e o desenvolvimento de doenças e comorbidades relacionadas ao vírus não está totalmente esclarecida, apesar de haver indícios de maior propensão ao desenvolvimento de linfoma nestes animais (Jackson et al., 1993; Gabor et al., 2001). Adicionalmente, em situações de imunossupressão pode ocorrer a reativação do vírus, a partir da expressão de RNAs mensageiros que sintetizam as proteínas do vírion e RNA genômico, levando à formação, replicação e liberação de partículas virais com consequente infecção de novas células, podendo o animal que estava no estado regressor do FeLV evoluir para a forma progressiva da doença (Figueiredo e Araújo Jr., 2011; Willett e Hosie, 2013; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020).

Na infecção regressiva, a viremia inicial pode causar prostração, febre e linfadenomegalia (Hartman, 2012; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020) e o diagnóstico pode ser obtido por meio da detecção do DNA proviral no exame de PCR da medula óssea ou sangue (Figueiredo e Araújo Jr., 2011; Hartman, 2012).

A infecção progressiva, que representa 30 a 40% dos casos de FeLV, e acomete principalmente gatos jovens, é caracterizada por viremia persistente em animais que não apresentaram resposta imune adequada. Consequentemente, esses animais possuem uma maior probabilidade de desenvolver alterações hematopoiéticas e comorbidades relacionadas ao FeLV, o que reduz a sua sobrevivência (Hardy et al., 1973; Sparkes, 1997; Hartmann, 2012; Westman et al., 2019). As principais alterações hematopoiéticas relacionadas com essa fase são ascitopenias, imunossupressão e o linfoma. O prognóstico para esses animais geralmente é desfavorável, com mediana de sobrevivência de 2,4 anos e óbito de 80% em três anos, embora alguns pacientes possam sobreviver por vários anos sem apresentar doenças relacionadas ao FeLV (Lutz et al., 2009; Almeida et al., 2021).

Na infecção focal ou atípica a replicação viral ocorre em quantidade reduzida, e em apenas um local específico, como as glândulas mamárias, bexiga ou olhos. Não se sabe ao certo a frequência desse tipo de infecção a campo, mas em infecções experimentais corresponde a 10% dos casos (Levy et al., 2008). Esses animais podem apresentar resultado fraco positivo no teste antigênico ou resultados conflitantes durante a

tentativa de diagnóstico, devido à variação na presença ou não de antígeno (Levy et al., 2008; Hartmann, 2012; Figueiredo e Araújo Jr., 2011; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020).

2.1.3 Apresentações e sintomatologia clínica

A apresentação clínica do FeLV é variável, e geralmente está associada à imunossupressão, anemia e/ou linfoma provocados pelo vírus (Lutz et al., 2009). Após um período assintomático os animais podem desenvolver diversos sintomas e síndromes, dentre elas a anemia, tumores, alterações associadas à imunossupressão, doenças concomitantes, desordens hematopoiéticas, doenças imunomediadas e outrassíndromes, como neuropatias e desordens reprodutivas (Hartmann, 2012a; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020).

O desenvolvimento de doenças relacionadas ao FeLV, a apresentação clínica, presença de síndromes associadas e prognóstico de felinos infectados, são determinados por diversos fatores, dentre eles o subtipo infectante, a imunocompetência do hospedeiro, idade, ambiente e população em que vive, vacinação e doenças associadas (Hartmann, 2012a). Neonatos infectados podem apresentar atrofia tímica desenvolvendo imunossupressão grave com consequente fraqueza e óbito (Levy, 2000).

A sintomatologia clínica dos animais infectados pelo FeLV pode ser muito variável e inespecífica e está relacionada tanto à patogenicidade do próprio vírus quanto de doenças concomitantes. Os sinais variam desde mucosas pálidas, dispnéia, febre, anorexia, emagrecimento progressivo, uveíte, rinite, conjuntivite, desidratação e abscessos, até o aumento de órgãos examinados à palpação, como linfonodos, fígado e baço (Sousa e Teixeira, 2003; Ettinger e Feldman, 2005).

Entre os acometimentos mais comuns causados pela FeLV está a supressão da medula óssea, provocando anemia, trombocitopenia, neutropenia e, eventualmente, pancitopenia. Isso pode ser causado pela replicação ativa do vírus na fase de viremia persistente, mas também pela presença do provírus integrado ao genoma, provocando alterações em genes adjacentes e podendo induzir antígenos de superfície com destruição imunomediada das células (Stutzer, 2010; Hartmann, 2011).

Em relação ao subtipo, o FeLV-A está associado à infecção assintomática prolongada, podendo posteriormente causar linfoma de células T no timo/mediastino (Ahmad e Levy, 2010). O subtipo FeLV-B está associado à malignidade e neoplasias hematopoiéticas (Hartmann, 2012). A presença do FeLV-B foi observada em 50% dos linfomas tímicos de células T e em 25% dos linfomas multicêntricos, não sendo associado às doenças mieloproliferativas ou mastocíticas. O FeLV-B geralmente é encontrado em tecidos que apresentam linfoma, gatos assintomáticos ou associados à outras doenças (Bolin e Levy, 2011).

O subtipo C, por sua vez, está associado a anemias arregenerativas (Hartmann, 2012). As proteínas de superfície do FeLV-C interferem a expressão e função da FLVCR que é uma proteína transportadora de heme que se apresenta em células que fazem síntese e transporte de heme. O transportador atua na diferenciação e divisão de precursores eritróides podendo causar a diminuição e perda dessas células (Quigley, 2004). Essas alterações irão causar anemia grave, diminuição de reticulócitos e ausência de precursores eritróides na avaliação da medula óssea (Weiss e Wardrop, 2011).

O subtipo T é citolítico aos linfócitos T, estando associado à imunossupressão e doenças concomitantes (Donahue et al., 1991). O subtipo FeLV-T apresenta em seu envelope um receptor de membrana e uma segunda proteína receptora (FeLIX) para infectar linfócitos T (Hartmann, 2012).

Existe uma alta incidência de citopenias associadas ao FeLV, refletindo em diminuição na contagem dos eritrócitos, neutrófilos e plaquetas decorrente principalmente do acometimento medular provocado pelo vírus (Gleich e Hartmann, 2009). A anemia é a segunda principal alteração causada pelo FeLV, após a ocorrência de neoplasias, e, associada com alterações imunossupressoras, é o principal motivo dos animais infectados serem levados ao veterinário (Hartmann, 2012a). As anemias relacionadas ao FeLV são geralmente arregenerativas, e relacionadas à hipoplasia eritróide, destruição medular (mielofibrose ou mielofitise) e anemia da doença crônica / doença renal crônica (Hartmann, 2012a).

O FeLV-C interfere em receptores de membrana impedindo a formação de células precursoras eritróides provocando hipoplasia medular eritróide com anemia grave

(Weiss e Wardrop, 2011). Southard et al. (2016), observaram ausência de precursores eritróides em medula óssea em um felino doméstico com FeLV e anemia grave associado com mielofibrose moderada. Entretanto, as anemias relacionadas ao FeLV podem, ainda, ser regenerativas em até 10% dos casos, devido à hemólise (anemia hemolítica imunomediada) ou hemorragia (Shelton e Linenberger, 1995).

A anemia hemolítica imunomediada pode ser desencadeada pelo FeLV, com destruição das hemácias, podendo acometer, ainda, as plaquetas, sendo relatado, ainda, o envolvimento de agentes infecciosos como o *Mycoplasma haemofelis* na destruição imunomediada das hemácias (Kociba, 1986; Hartmann, 2011). Hemorragias podem surgir em decorrência de trombocitopenias causadas pelo vírus, pela trombocitopenia imunomediada ou supressão/destruição medular (Hartmann, 2011). Em um estudo realizado por Costa e colaboradores (2017) 30,7% dos 153 felinos positivos para FeLV apresentaram anemia, sendo que, considerando a contagem de reticulócitos agregados, 56% foram regenerativas, um resultado similar ao encontrado por Gleich e Hartmann (2009) que observaram anemia em 42% dos animais positivos para FeLV.

O FeLV pode resultar, ainda, em imunossupressão, que pode favorecer o desenvolvimento de neoplasias, mas também a ocorrência de infecções secundárias. O mecanismo da imunossupressão causada pelo vírus deve ser mais estudado, considerando a diferença nos graus de imunossupressão nos animais infectados. Sugere-se que os animais podem desenvolver atrofia tímica, e depleção da zona paracortical de linfonodos após a infecção. Os neutrófilos de animais virêmicos podem diminuir sua atividade quimiotática e fagocítica, e a neutropenia e linfopenia são comuns (Quakenbush et al., 1990; Hoffmann-Fezer et al., 1996; Gleich e Hartmann, 2009; Figueiredo et al., 2017). Além disso, pode ocorrer uma diminuição da produção de imunoglobulinas, interleucinas e TNF-alfa (Diehl e Hoover, 1992; Hartmann, 2012; Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020).

No estudo realizado por Meichner et al. (2012), foi observada uma alteração na comparação do perfil de animais que apresentaram linfoma na década de 1980 e início dos anos 1990 para os animais que apresentaram a doença do final da década de 1990 até o final da década de 2000, na América do Norte. No primeiro período, os gatos

com linfoma usualmente apresentavam viremia persistente pelo FeLV, com maior incidência de linfomas mediastinais e multicêntricos, enquanto nas décadas seguintes observou-se uma redução considerável da infecção progressiva pelo FeLV, relacionada à medidas de controle que incluíram segregação, extermínio e vacinação, mas ainda com alta incidência de linfomas, predominando, entretanto, a apresentação gastrointestinal.

O FeLV está associado à formação de neoplasias, aumentando o risco em 62,1 vezes, principalmente de linfomas e leucemias (Shelton et al., 1990). Isso ocorre através de mutações insercionais ou recombinações causadas pela integração do provírus ao genoma celular próximo a um oncogene, causando ativação e superexpressão desse gene com consequente proliferação descontrolada dessas células (Bolin e Levy, 2011; Hartmann 2012a; Figueiredo e Araújo Jr., 2011). Esse evento ocorre com a expressão de genes retrovirais que é dirigida pelas repetições terminais longas (LTRs) geradas no fim do genoma próviral pela transcrição reversa, ativando os (proto)-oncogenes adjacentes do hospedeiro, gerando mutações e inserções com transformações celulares e consequente formação das neoplasias (Bolin e Levy, 2011).

O principal agente relacionado à formação de neoplasias associadas ao FeLV é o subgrupo B. Alguns estudos sugerem que gatos infectados com FeLV que desenvolveram leucemia mielóide aguda e síndromes mielodisplásicas podem apresentar alterações nas LTRs (repetições de uma sequência específica – clone33) que difere dos animais infectados que não desenvolveram as alterações medulares (Hartmann 2012a). Em leucemias mielóides agudas foram identificadas regiões de repetições de acentuadores, conferindo aumento da expressão de genes em células mielóides, o que sugere a associação dessas repetições com a formação dessa leucemia (Nishigaki et. al, 1997).

Outro mecanismo relacionado ao desenvolvimento de neoplasias em gatos infectados pelo FeLV é a presença do antígeno do oncornavírus felino associado à membrana celular (FOCMA, "*feline oncornavirus-associated cell membrane antigen*"), ele é expresso na superfície da célula infectada. Quando ocorre sua expressão aumenta a probabilidade do gato infectado apresentar neoplasias, mas quando ocorre a produção

de anticorpos contra o FOCMA o animal apresenta resistência para a formação de tumores relacionados a esse mecanismo (Hardy, 1987; Lappin, 1998).

Os principais tipos de linfoma associados ao FeLV são o linfoma mediastinal, geralmente em gatos com idade inferior a três anos, e o linfoma multicêntrico (Weiss, 2010; Cristo et al., 2020). A maior parte das leucemias relacionadas com o FeLV são linfóides, mas pode ocorrer com outras linhagens celulares. Em gatos com leucemias agudas, 70% apresentam antigenemia persistente pelo FeLV (Horta et al., 2021). Síndromes mielodisplásicas, caracterizadas por citopenias e mudanças displásicas na medula são usualmente observadas em gatos, como um pré-estágio da leucemia mielóide aguda (Hartmann, 2012a). Na leucemia aguda, as células blásticas ocupam a medula óssea massivamente impedindo a divisão e maturação normal das células (Hisasue et al., 2001; Horta et al., 2021).

Os sinais clínicos da leucemia aguda incluem a letargia (devido à anemia), seps (neutropenia), hemorragia (trombocitopenia), hepatomegalia e esplenomegalia. O diagnóstico das leucemias agudas é realizado através das contagens células no sangue total, podendo-se observar a presença de blastos na circulação, e na avaliação citológica da medula óssea, podendo-se observar aumento da celularidade, principalmente células blásticas, mielofibrose e diminuição das outras células e estruturas presentes normalmente na medula óssea (Shelton e Linenberger, 1995). O tipo celular envolvido nas leucemias agudas, principalmente nas não linfóides, é de difícil definição já que na maioria dos casos a transformação ocorre no nível muito próximo das células-progenitoras, em células pouco diferenciadas (Hartmann, 2012).

A leucemia mielomonocítica aguda e a leucemia monoblástica aguda foram diagnosticadas em animais infectados pelo vírus da leucemia felina (Prihirunkit e Narkkong, 2008). O diagnóstico precoce da leucemia em gatos infectados permite a implantação de medidas para prevenção da disseminação do vírus, com medidas de segregação e vacinação, além de permitir a otimização dos cuidados com a saúde de gatos infectados, podendo prevenir infecção e diagnosticar doenças relacionadas ao vírus de forma precoce (Crawford, 2011). Esses gatos devem ser monitorados com a

realização de exame físico, hemograma completo, perfil bioquímico, urinálise e radiografias torácicas a cada seis a 12 meses, e devem ser castrados (Lutz et al., 2009).

2.2 Diagnóstico do FeLV

O diagnóstico do FeLV pode ser realizado através de testes sorológicos e moleculares. Deve-se realizá-los levando em consideração as diferenças na sensibilidade e especificidade, eficiência na produção de anticorpos e o tempo de exposição, podendo haver a necessidade de repetição para confirmação de resultados negativos em gatos expostos ao vírus. A escolha do teste é de extrema importância para avaliação do tipo de infecção e prognóstico dos animais (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

A realização do diagnóstico do FeLV é de extrema importância, pois a segregação de gatos infectados é a medida de controle mais eficaz para impedir a transmissão do vírus. O acompanhamento dos gatos positivos evita a transmissão da doença, possibilita um acompanhamento efetivo desses animais e das alterações provocadas pelo vírus, podendo aumentar a sobrevivência e qualidade de vida desses animais (Hartmann, 2012).

Gatos não infectados por retrovírus devem ser vacinados e observados em relação à exposição à felinos infectados, sendo importante atentar aos períodos nos quais o antígeno ou anticorpos não são detectados pelos testes (Little et al., 2020). Vacinas comercialmente distribuídas, inativadas, previnem a infecção pelo vírus e doenças relacionadas ao FeLV (Grosenbaugh et al., 2004; Hoffmann-Lehmann et al., 2007). A vacinação não interfere nos testes diagnósticos disponíveis, mas recomenda-se a testagem dos gatos antes da vacinação (Little et al., 2020).

2.2.1 Métodos de detecção do antígeno viral

A proteína p27, altamente conservada no FeLV é a mais abundante em animais infectados pelo FeLV em fase de viremia (persistente em gatos na forma progressiva da infecção). Diversos testes rápidos que detectam a presença dessa proteína estão disponíveis no mercado. Esses testes apresentam variações na especificidade e sensibilidade, devendo-se ter cuidado na utilização e interpretação (Parry, 2018).

Os testes que detectam a p27 devem ser realizados na prática clínica nas seguintes condições: animais suspeitos de terem a infecção, animais doentes, antes de vacinação, gatos com histórico desconhecido relacionado ao FeLV, detecção de animais infectados em abrigos e na introdução de um gato em um novo ambiente (Hoffmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

O teste para detecção do antígeno p27 ELISA - *point-of-care* (POC) –é um teste de triagem que pode ser realizado com plasma, soro ou sangue total. Esse teste pode apresentar resultado falso-positivo quando se utiliza sangue total, por ser um teste imunocromatográfico, e falso-negativo em casos de infecções recentes ou regressivas (Hartmann, 2012; Little et al. 2020; Mostl et al., 2013; Westman et al., 2019).

O uso de lágrimas ou saliva para os testes que detectam a p27 apresentou baixa sensibilidade em alguns estudos, com o uso de saliva apresentando detecção do antígeno em apenas 54% dos casos positivos (Westman et al., 2017).

O resultado positivo no teste ELISA SNAP apresenta resultados consistentes em animais com altas cargas virais no plasma e com antigenemia ativa apresentando altas concentrações da proteína p27 (Powers et al., 2018).

A imunocromatografia direta (IFA) detecta a presença da p27 dentro de neutrófilos e plaquetas a partir da ligação de anticorpos ao antígeno, entretanto a detecção ocorre apenas na fase mais avançada da infecção, a partir de três semanas da viremia, em gatos progressivos, sendo negativo nos gatos regressores. Representa uma boa escolha na determinação do tipo de infecção. Dentre as limitações desse teste estão a possibilidade do animal infectado apresentar resultado falso-negativo em casos de infecções recentes e menor sensibilidade em animais leucopênicos e trombocitopênicos. Resultados falso-negativos podem ocorrer ainda em esfregaços muito finos e/ou realizados com sangue anticoagulado ao invés de sangue fresco. Além disso, necessita de anticorpos, equipamentos especiais para leitura e pessoal treinado para a realização (Hartmann, 2012)

Todos os animais positivos no primeiro teste (ELISA ou IFA) devem ser testados novamente após seis semanas para que, no caso de uma infecção recente, seja

esclarecido se o animal progrediu para uma infecção regressiva com ausência de atigenemia ou se continuou a produção de antígeno permanecendo com infecção ativa, que caracteriza a forma progressiva da doença (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

Animais com resultados questionáveis como fraco positivo ou se a marca de positivo aparecer após o tempo sugerido no teste, devem ser retestados imediatamente, principalmente se a suspeita ou frequência de infecções na região for baixa. Para confirmação pode-se realizar PCR em tempo real para RNA ou DNA proviral (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020; Little et al., 2020).

2.2.2 Métodos de detecção viral

O PCR é um teste mais sensível que outras técnicas utilizadas, além de fornecer dados para estudos da patogenia da doença (Hofmann-Lehmann et al., 2008). Hofmann-Lehmann et al. (2001) observaram que 10% das amostras negativas para o ELISA apresentaram resultado positivo no qPCR (PCR em tempo real), mostrando uma maior sensibilidade principalmente em infecções recentes, quando o ELISA ainda não é sensível o suficiente para demonstrar resultados positivos.

O qPCR quantifica a presença do próviro nas células do sangue ou medula óssea do felino infectado, sendo que animais com maiores concentrações de próviro após a exposição tendem a ter progressão da doença. O qPCR detecta a presença de DNA proviral após uma semana de infecção enquanto os métodos de diagnósticos envolvendo a p27 demandam um tempo maior para o diagnóstico, mas nessa fase não é possível ainda indicar o tipo de infecção que o animal irá desenvolver (Hofmann-Lehmann et al., 2001; Figueiredo e Araújo, 2011).

O qPCR para detecção de DNA proviral apresenta vantagens sobre as outras técnicas moleculares pois determina a quantidade de DNA proviral, podendo-se assim estabelecer um prognóstico e definir a classificação da doença, sendo que, animais com infecção regressiva apresentam menor carga de DNA proviral. Pode também ser utilizado como marcador de progressão clínica, acompanhando os animais com infecções progressivas ou regressivas (Goto et al., 2002). Dos testes disponíveis para

avaliação da presença do FeLV, o qPCR é o mais confiável em casos de animais negativos (Azevedo, 2008).

O PCR para detecção do DNA proviral, já incorporado no DNA do hospedeiro, deve ser realizado nas seguintes condições: como teste confirmatório para exames questionáveis que detectam a p27, na pesquisa de animais infectados regressivamente pelo FeLV, detecção anterior aos testes relacionados à detecção da p27, confirmar ausência de animais infectados em abrigos, em casos nos quais existe a suspeita de infecção mas não apresenta resultados positivos em outros testes e na testagem de doadores sanguíneos (Hofmann-Lehmann et al., 2008; Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020).

Em casos positivos para a presença de DNA proviral em sangue ou medula óssea, deve diferenciá-los através de testes que detectam a proteína p27 ou através do PCR para o RNA viral (Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020). A infecção progressiva é diferenciada da regressiva a partir de repetições de testes de antígenos no sangue periférico, sendo que, os gatos que apresentaram infecções regressivas se tornarão negativos para o teste de antígeno dentro de 16 semanas após a exposição, enquanto animais acometidos pela forma progressiva continuarão com resultados positivos para antígeno. Os animais acometidos por ambos tipos de infecção irão apresentar DNA proviral no sangue periférico, oriundos do envolvimento na medula óssea que libera neutrófilos e plaquetas infectados na circulação, entretanto, animais regressivos apresentam baixa carga proviral, enquanto os animais progressivos apresentam altas cargas de DNA proviral, diferença detectada pelo aspecto quantitativo do qPCR (Torres et al, 2005; Pepin et al., 2007).

Podem também ser utilizados swabs orais, conjuntivais e retais para a realização de PCR para detecção do DNA proviral, mas essas amostras apresentam resultados inferiores às amostras de sangue e medula óssea, embora sejam válidas para coleta menos invasivo e tecnicamente mais simples (Victor et al., 2020).

Beall et al. (2021) realizaram testes quantitativos (qPCR real time e ELISA na placa) em animais positivos no teste rápido ELISA, acompanhando esses gatos por vários anos. Os animais que apresentaram baixas concentrações do antígeno p27 ao longo do

experimento apresentaram maior tempo de sobrevivência e menor número de mortes. A taxa de sobrevivência do grupo com altas cargas virais foi de 24,4%, enquanto no grupo com baixas cargas e no grupo controle foram encontradas as taxas de 93,1% (27/29) e 87,5% (7/8), respectivamente, relacionando-se assim a carga viral com a sobrevivência dos animais infectados. Esse dado foi corroborado por Duda et al. (2020) que associaram aumento de alterações hematológicas e clínicas em medula óssea em animais que apresentaram maior carga de DNA proviral que foram representados pelos grupos de animais progressivos sintomáticos e assintomáticos quando comparados a grupos de animais com infecção regressiva ou saudáveis.

O RNA viral, por sua vez, pode ser encontrado em quantidades reduzidas, no sangue periférico de gatos com infecção regressiva, podendo haver maior risco de reativação viral em relação aos gatos regressivos que não apresentam RNA viral detectável. Esses animais, geralmente mantêm resultado negativo em testes para o antígeno viral no sangue periférico ou plasma (Torres, et al., 2005; Hofmann-Lehmann et al., 2007).

A pesquisa do RNA viral (RT-PCR) não é realizada com frequência na rotina clínica. A presença de RNA viral na saliva indica infecção ativa (forma progressiva) e é indicado como teste confirmatório para exames questionáveis realizados anteriormente e em abrigos, onde a coleta de sangue de muitos animais pode ser extremamente dificultada e pode-se realizar os testes com um “pool” de amostras, sendo uma forma eficaz e barata para dar um parâmetro de infecção desses abrigos. Além disso, a detecção do RNA viral através dessa técnica fornece resultado positivo até duas semanas antes dos testes de antígeno, sendo realizada até uma semana após a exposição (Levy et al., 2004; Hofmann-Lehmann e Hartmann, 2020). Foi sugerido por Tandom et al. (2005) que a realização da detecção do RNA viral também é uma ferramenta que pode ser utilizada para o diagnóstico recente das infecções, além disso utiliza-se a detecção do vírus através do RNA para auxiliar no diagnóstico de infecções atípicas com baixa concentração da p27 no sangue e DNA proviral não detectável, impedindo a utilização de outras metodologias.

Em um estudo, Hoffmann-Lehmann et al. (2008) encontraram baixas concentrações de RNA viral em alguns animais que não apresentavam resultados positivos nos testes

que detectam a p27 e moderadas concentrações de DNA proviral, sugeriu-se então que esses animais apresentavam infecção regressiva podendo o RNA viral estar presente ou não para essa classificação, enquanto animais com infecção progressiva apresentam altas concentrações de RNA viral e DNA proviral, além de resultados positivos nos testes para a p27.

Uma das desvantagens das técnicas moleculares são a necessidade de um laboratório bem equipado e uma equipe experiente para que não haja contaminações e erros de técnicas. Também podem ocorrer falsos negativos devido à sensibilidade do vírus à mutações no genoma, que mesmo sendo pequenas já podem provocar a não ligação ao primer não ocorrendo sua amplificação com consequente resultado não confiável. A análise genômica do vírus da FeLV deve ser constantemente realizada para que essas mutações não impeçam um resultado confiável (Levy et al., 2008; Aquino, 2012)

O isolamento viral não é realizado rotineiramente devido à complexidade da técnica, como tempo necessário para o cultivo viral que se não for respeitado pode apresentar resultado falso-negativo, preço e necessidade de laboratórios específicos (Barr, 1996).

2.2.3 Métodos de detecção de anticorpos

A avaliação de anticorpos contra o FeLV não é frequente na prática clínica pois não difere o tipo de infecção do animal, animais que entraram em contato com o vírus e o eliminaram (infecção abortiva) e nem mesmo aqueles vacinados (Hartmann, 2012).

2.2.4 Interferência dos tipos de infecção pelo FeLV no diagnóstico

Os diferentes tipos de infecção pelo FeLV podem causar erros na interpretação e/ou validação dos testes realizados. Para isso é necessário ter em mente o significado de cada teste e qual a metodologia utilizada, o que está explicado no quadro 1.

Quadro 1 - Avaliação dos resultados para testes diagnósticos do FeLV relacionando com as fases da infecção.

Tipo de Infecção	Antígeno		DNA Proviral no sangue	Viremia	Transmissão	Doenças Associadas
	POC	IFA				
Abortiva	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa	Negativo	Negativo
Regressiva	Negativo ou Positivo Transitório	Negativo	Positivo	Negativa ou Positiva Transitória	Negativo	Improvável
Progressiva	Positivo	Positivo	Positivo	Positiva	Positivo	Possível

2.2.5 Utilização dos testes na rotina clínica

A interpretação dos resultados de testes para detectar o FeLV não é simples e demanda do Médico Veterinário conhecimento sobre a patogenia e comportamento da doença, além do conhecimento sobre os testes realizados. A partir do entendimento da patogenia do FeLV, o clínico pode definir os melhores testes a se fazer naquele momento e, se for necessário confirmar após algum período dependendo do teste usado (Parry, 2018). Saber determinar quando e qual teste deve ser realizado é de extrema importância na prática clínica para que se tenha confiança nos resultados, para que não existam gastos e nem coleta de amostras de forma desnecessária (Hartmann e Hofmann-Lehmann, 2020).

Não existe um protocolo definido de testagem, pois deve-se levar em consideração situações individuais. Para a testagem, deve-se levar em consideração a exposição do animal, convivência com outros felinos, idade, gênero e vacinação. Gatos não vacinados, machos, jovens, com acesso extradomiciliar, apresentam maior risco de infecção e, quando houver exposição recente, recomenda-se a repetição ou complementação dos testes para confirmação do resultado, principalmente quando negativo (Hoover e Mullins, 1991; Gleich e Hartmann, 2009). Gatos expostos à situações de risco devem ser testados, independente da presença de sintomatologia clínica. A infecção pelo FeLV, mesmo na forma progressiva, pode permanecer assintomática por longos períodos (Little et al., 2020). Em regiões endêmicas, todos os gatos atendidos em serviços veterinários devem ser testados caso não haja testes prévios (Parry, 2018). É importante também que os gatos sejam testados antes da vacinação. Doadores de sangue devem ser testados através do PCR, que é o teste que

detecta até as menores cargas de DNA próviral, além de detectar a infecção mais precocemente, com tempo inferior a duas semanas. Animais positivos não devem ser doadores, mesmo o sangue total não sendo o método mais comum de infecção (Parry, 2018).

As diferentes formas de infecção podem gerar confusão na interpretação e/ou validação dos exames. Muitas vezes, o Médico Veterinário deve realizar mais de um teste com metodologias variadas e em períodos diferentes para se obter um diagnóstico fidedigno à situação do animal e classificação da sua infecção. Resultados negativos para infecção progressiva (teste imunoenzimático com identificação do antígeno) são confiáveis, mas em situações nas quais o animal foi exposto, deve-se realizar novo teste em 30 dias, pois há a possibilidade do resultado estar relacionado ao período pré-antigenemia (Little et al., 2020). Felinos possivelmente expostos ao vírus em um prazo anterior de até 30 dias devem ser retestados pelo teste imunoenzimático entre quatro e oito semanas para avaliação da presença de antigenemia (Sykes e Hartmann, 2013).

Figueiredo e Araújo (2011) sugerem que são necessários dois tipos de testes para determinar o status de um felino em relação ao FeLV, primeiramente um PCR para avaliar a presença de DNA próviral seguido de um teste de antígeno. Para se obter o correto status da infecção pelo FeLV, além do teste rápido, deve-se realizar testes adicionais como o pcr e/ou IFA e em alguns casos repetir o teste após 30 dias em casos de suspeita de infecções recentes. Isso deve ser realizado devido à patogenia da doença, que pode evoluir de várias formas, a exemplo dos casos de infecções regressivas, exposição recente ou reações atípicas. Por esses motivos, não é possível recomendar um único protocolo para todos os gatos (Little et al., 2020).

2.3 Medula óssea em gatos infectados pelo FeLV

2.3.1 Aspectos gerais da ação do FeLV na medula óssea

Os animais acometidos pelo FeLV podem apresentar diversas alterações hematopoiéticas, predisposição à formação de neoplasias como linfoma e leucemias, mielossupressão e maior vulnerabilidade à outras infecções (Hartmann, 2012).

O FeLV infecta linhagens hematopoiéticas, mas também células acessórias no microambiente medular, como os fibroblastos. As células da medula óssea tornam-se infectadas de duas a seis semanas após a exposição, sendo detectadas partículas virais nesse período também em leucócitos do sangue periférico através do teste de imunocromatografia direta (Linenberger e Abkowitz, 1995).

A patogenia do FeLV na medula óssea geralmente ocorre em felinos com infecções progressivas, onde há viremia persistente, associada à replicação constante do vírus. Entretanto, os animais com infecção regressiva, com a presença do DNA proviral em células da medula óssea, podem apresentar alterações no ambiente medular, com alteração da expressão gênica (principalmente silenciamento), além das possíveis alterações nas funções das células que contém o provírus em seu DNA (Stutzer et al, 2010). Também podem ocorrer alterações na apresentação antigênica pelas células dendríticas desencadeando destruição imunomediada dos componentes da medula óssea (Hartmann, 2012a).

A associação entre o FeLV e outras doenças podem agravar as alterações medulares, sendo importante o diagnóstico para acompanhamento e para que medidas de controle possam ser implementadas (Hartmann, 2012). As alterações provocadas pelo FeLV na medula óssea são extremamente variáveis. No início da viremia pode ocorrer anemiaacompanhada de pancitopenia e hipocelularidade medular (Pedersen et al., 1977).

Gatos infectados pelo FeLV-C podem desenvolver aplasia de células precursoras eritróides (Shelton et al., 1995). Ainda, podem ocorrer síndromes mielodisplásicas, caracterizadas por hiper celularidade, anormalidades na maturação celular, aumento nas células imaturas (blásticas) e mielofibrose (Blue, 1988a; Maggio et al., 1978). Linfomas e leucemias relacionadas ao FeLV podem resultar ainda em mielofitose com medula óssea repleta de células blásticas e depleção das demais linhagens celulares (Modiano, 2010).

A ação do vírus na medula óssea pode ter como consequência diversas alterações no sangue periférico, como anemia, neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, linfocitose, pancitopenia (Gleich e Hartmann, 2009; Hartmann, 2012a; Duda et al.,

2020). A replicação viral em células precursoras da medula óssea causa mutações que podem desencadear alterações no ambiente medular, proliferação de células neoplásicas com consequentes citopenias em sangue periférico e alterações mielodisplásicas na medula óssea (Hartmann, 2012a). Os felinos são mais predispostos à alterações mieloproliferativas que outras espécies, devido a existência do FeLV (Costa et al., 2017).

A supressão da medula óssea é a síndrome clínica mais comum em gatos infectados pelo FeLV sendo relatado anemia, neutropenia, anormalidades plaquetárias, pancitopenia e alterações neoplásicas (Levy e Crowford, 2008; Ferreira et al., 2017). A maior parte das alterações supressoras da medula óssea ocorrem em animais com infecções progressivas, mas também podem estar associadas à infecções regressivas (Stutzer et al., 2010). Essa supressão medular pode ocorrer por diversos mecanismos, dentre eles o resultado da infecção de células-tronco hematopoiéticas e células do estroma no ambiente medular, e a destruição imunomediada das células mediada pela indução da expressão de antígenos de superfície pelo provírus (Gleich e Hartmann, 2009).

Outras formas de supressão medular são a invasão de populações celulares na medula óssea, como em leucemias e hiperplasia de neutrófilos que ocupam o espaço medular em detrimento da multiplicação de células hematopoiéticas. Situações em que ocorre mielofibrose e mielofitose com a multiplicação e aumento anormal de células e componentes do estroma medular com estimulação crônica da medula óssea (Shimoda et al., 2000; Hartmann, 2012a).

A hipoplasia medular é caracterizada por mais de 75% da medula óssea composta por tecido adiposo, podendo ocorrer ainda, de forma generalizada (e associada à pancitopenia), ou seletiva, acometendo a linhagem eritróide e, por vezes, megacariocítica ou granulocítica (Harvey, 1984). A infecção por FeLV, particularmente do FeLV-C, pode provocar algum nível de hipoplasia medular, mas a aplasia completa não é um achado comum (Cotter, 1979; Weiss, 1976). A aplasia da medula óssea em felinos foi associada, ainda, com infecção por parvovirus e reações à

fármacos (azatioprina, albendazol, griseofulvina, ribavirina, chlorambucil e melfalano) (Weiss e Wardrop, 2010)

A infecção pelo FeLV pode resultar também em casos de infecção pelo FeLV (Shimoda et al., 2020). Shimoda et al. (2000) realizaram o diagnóstico através da avaliação de um animal infectado que apresentava pancitopenia e, quando a medula foi avaliada apresentou tecido em necrose o que foi correlacionado à mielossupressão decorrente do vírus.

2.3.2 Avaliação da medula óssea

A punção de medula óssea em gatos com suspeita ou infecção pelo vírus da leucemia felina deve ser realizada em casos de alterações observadas no hemograma como citopenias, alterações morfológicas e de maturação das células, presença de blastos na corrente sanguínea entre outras suspeitas (Costa et al., 2017). A medula óssea deve ser observada juntamente com o hemograma atual do animal para permitir a associação e inferências adequadas (Jain, 1993a).

A avaliação citológica da medula óssea deve-se iniciar pela avaliação da presença ou não de partículas (espículas). A presença de partículas é essencial para certificar a correta coleta de material, além de ser necessária para contagem de megacariócitos e observação da celularidade. Citologicamente uma medula óssea normal deve-se apresentar heterogênea, uma vez que um aspecto homogêneo denota alterações em algumas linhagens celulares (Harvey, 2012).

A celularidade é dada como a porcentagem de celularidade presente na partícula, em contrapartida com a parte de gordura. A celularidade normal do animal adulto pode ser representada por 50% de células e 50% de gordura nas partículas, mas pode variar de acordo com a espécie, o local de coleta e a idade do animal, sendo que a celularidade diminui com o aumento da idade (Harvey, 1984; Weiss e Wardrop, 2010).

A contagem de megacariócitos é realizada por partícula, considerando a média entre as partículas, com avaliação, ainda, da maturação e morfologia (Harvey, 2012). A interpretação do número de megacariócitos deve ser sempre realizada em associação

com a contagem de plaquetas no sangue periférico. Em animais com aumento do consumo ou da destruição das plaquetas a contagem de megacariócitos deve estar aumentada para maior produção desse componente sanguíneo (Stockham e Scoot, 2008).

A contagem celular para avaliação da distribuição, diferenciação e relação mielóide:eritróide é realizada em 500 células (Harvey, 2012). Neste contexto, o termo mielóide, refere-se às células da linhagem granulocítica (mielocítica). A diferenciação das células mielóides e eritróides é mais facilmente realizada em amostras que foram coletadas por punção comparando-se às amostras de biópsia (Harvey, 2012). Deve-se realizar a contagem em campos nos quais as células estão identificáveis, não sobrepostas e nem estouradas, e em campos diferentes, pois alguns campos podem ter maior concentração de determinadas linhagens. A relação mielóide:eritróide (M:E) depende da espécie e varia entre 0,5 a 3,1 (Thrall, 2007). Em gatos a relação M:E pode variar entre 1 e 3. Deve-se realizar a interpretação dessa relação comparando com o hemograma recente para a correta interpretação (Harvey, 2012).

Em gatos a reserva de ferro não é observada em estados normais, sua ausência não pode ser utilizada como diagnóstico para deficiência de ferro. A presença de ferro disponível na medula óssea de gatos pode ocorrer após a transfusão sanguínea ou indicar desordens mieloproliferativas ou anemia hemolítica (Franks et al., 1986; March, 2005; Harvey, 2012).

Segundo Costa et al. (2017), a coleta de medula óssea em felinos deve ser realizada com o animal sedado conjuntamente com a aplicação de lidocaína 2% no local a ser puncionado, geralmente na porção proximal do úmero, fossa trocântérica do fêmur e na crista ilíaca. O local deve ser preparado com tricotomia e antissepsia. A agulha deve ser inserida no osso até avançar alguns milímetros após a perfuração, deve-se então acoplar seringa realizando vácuo com pressão. Após o início da saída de material da medula óssea não se deve estender muito a coleta pela possibilidade de contaminação com sangue periférico alterando e prejudicando a análise posterior. O material retirado deve ser colocado em placa de petri com anticoagulante e as partículas serem coletadas através de um tubo de microhematócrito ou pipeta. Deve ser realizado um “squash” do

material na lâmina. Após a secagem a amostra deve ser corada de acordo com a preferência do laboratório, podendo-se utilizar o corante rápido ou outro corante Romanovski (Giemsa, MGG, Wright) para a avaliação.

2.3.3 Desordens mieloproliferativas

Desordens mieloproliferativas incluem as leucemias e as síndromes mielodisplásicas (SMD, ou mielodisplasias), com estas últimas sendo consideradas um estado pré-leucêmico (Raskin e Meyer, 2016). Cerca de 90% das leucemias mielóides agudas e 70% das leucemias linfóides agudas detectadas em felinos domésticos ocorrem devido à presença de infecção pelo FeLV, assim como 75% das SMD (Cotter e Holzworth, 1987; Jain, 1993; Linenberger e Abkowitz, 1995; Ogilvie e Moore, 2001).

A presença do vírus nos precursores hematopoiéticos na medula óssea pode resultar em recombinação ou rearranjo genético nas sequências relacionadas à proliferação, crescimento e maturação celular (Thrall, 2007). A replicação viral em células precursoras causa mutações que podem desencadear transformações neoplásicas na medula óssea (Hartmann, 2012a; Meichner et al., 2012). A redução da vigilância imunológica causada pela imunossupressão consequente da ação viral também aumenta as chances do animal infectado desenvolver neoplasias (Ogilvie, et al., 1988).

A leucemia, a proliferação maligna de células da medula óssea, é classificada de acordo com a linhagem celular mieloide ou linfóide envolvida. Deve ser ainda sub-classificada como aguda, quando envolve alguma linhagem de células precursoras, e crônica, quando envolve algum tipo de células maduras (Dobson et al., 2006; Arber et al, 2016) O risco de desenvolver linfoma e leucemias é 62 vezes maior em animais infectados devido à inserção do DNA próviral no material genético, usualmente próximo a proto-oncogenes, aumentando sua transcrição o que favorece a transformação neoplásica (Shelton et al., 1990; Reche Júnior et al., 1997; Reinacher, 1989; Hartmann 2012a).

Nas leucemias agudas a medula óssea está repleta de blastos com consequente supressão da produção celular, sendo associada à reduzida expectativa de vida (Hisasue et al, 2001). O tipo de leucemia mais comum em animais portadores do vírus

da leucemia felina na forma progressiva é a leucemia linfóide aguda que acomete linfoblastos e pró-linfócitos (Essex, 1982). Gatos que apresentam leucemia linfoblástica (aguda) de células T são geralmente jovens com infecção progressiva pelo FeLV (Levy et al., 2006; Lutz et al, 2009).

Em um estudo realizado por Almeida et al. (2021); 26,6% (34/128) dos animais infectados pelo FeLV apresentaram neoplasia, sendo 27 linfomas e quatro leucemias linfóides agudas. Três animais FeLV positivos desenvolveram ainda carcinoma tubularmamário, mastocitoma esplênico e tumor retrobulbar não especificado. A taxa de leucemia nos animais com FeLV progressivo, detectado pelo teste SNAP, variou de 3,0 a 6,9% em estudos realizados em Santa Catarina (Biezus et al., 2019; Almeida et al., 2020).

A leucemia pode ter origem primária na medula óssea, mas pode ser secundária ao linfoma (estágio V ou fase leucêmica). Ambas são as formas mais comuns de neoplasias associadas ao FeLV, e geralmente as leucemias decorrentes de linfomas se diferenciam por uma distribuição tecidual predominante e envolvimento tardio do sangue periférico (Stockham e Scoot, 2008)

O diagnóstico de leucemia aguda se baseia na identificação de mais de 30% de blastos na medula óssea ou sangue periférico, entretanto, esse valor foi recentemente reduzido em cães e seres humanos para 20%, não havendo um consenso para os gatos (Arber et al., 2016). A citometria de fluxo também deve ser realizada para diferenciação do tipo celular envolvido, sendo o padrão ouro de confirmação do diagnóstico (Dobson et al., 2006). A trombocitopenia e a anemia geralmente ocorrem associadas às leucemias devido ao acometimento da medula óssea que se apresenta repleta de células neoplásicas, não produzindo as outras células normalmente (Tomiyasu et al, 2018).

As mielodisplasias são distúrbios que se originam nas células-tronco e alteram o processo natural de divisão e maturação celular, atingindo um grupo heterogêneo de células (Lorand-Metze, 2006). Nas SMD ocorre uma produção insuficiente das células do sangue pela medula devido a diversas alterações no ambiente medular (Lorand-Metze, 2009; Mattos et al., 2016).

A SMD caracteriza-se por citopenias no sangue periférico e alterações displásicas em linhagens específicas na medula óssea (com celularidade normal ou aumentada), correspondendo a um pré-estágio de leucemia mieloide aguda (Hartmann, 2012a). Podem ser classificadas, de acordo com o componente predominante, em SMD eritróide, com M:E<1 (>50% de células precursoras eritróides na medula óssea) e até 30% de blastos, e SMD mielóide com M:E >1 (<50% de células precursoras eritróides na medula óssea) associada à contagem restrita de blastos (<5%) ou excesso de blastos (5-29%) (Harvey, 1984). Apesar da tendência em se considerar o diagnóstico de leucemias agudas na presença de mais de 20% de blastos (Arber et al., 2016), não existem diretrizes estabelecidas em gatos.

Animais infectados pelo FeLV podem desenvolver alterações mieloproliferativas como leucemias e SMD, mas também mieloftise e mielofibrose de forma isolada ou associada (Gleich e Hartmann, 2009; Costa et al., 2017). Gatos com mielodisplasia quase sempre são infectados pelo FeLV, geralmente jovens ou de meia-idade (Gleich e Hartmann, 2009; Hartmann, 2012a).

Em um estudo realizado no Japão, dos 16 animais que apresentavam mielodisplasias, 15 (93,8%) apresentaram resultado positivo no teste imunocromatográfico para FeLV (Hisasue et al., 2001). Os sinais clínicos incluem letargia, anorexia e perda de peso, a sobrevivência desses animais é curta, podendo morrer após semanas do diagnóstico (Thrall, 2007). A progressão dos felinos que apresentam aSMD para leucemia pode ocorrer após semanas a meses do início das citopenias persistentes (Ogilvie e Moore, 2001).

A mielodisplasia surge concomitantemente com anemia não regenerativa, que é a alteração mais comum (Hisasue et al., 2001; Tomek et al., 2006), alterações no processo de maturação celular, podendo ocorrer mielofibrose em 56% dos casos (Blue, 1998; Ogilvie e Moore, 2001), redução de granulócitos e trombocitopenia (Lutz et al., 2009; Carmichael et al., 2002).

As alterações medulares causadas pelo FeLV como mielodisplasias e leucemia mielóide aguda, podem causar desgranulopoieses, uma alteração na produção e maturação de granulócitos. Hiperplasia neutrofílica ineficaz ocorre em desordens

mieloproliferativas e leucemias mielóides agudas, muito comum em gatos neutropênicos com FeLV ou FIV (Shimoda et al., 2000a; Tasca et al., 2009). Neutropenia persistente grave com hiperplasia granulocítica e alterações displásicas pode ser caracterizado como mielodisplasia e pode ocorrer em animais infectados pelo FeLV (Weiss e Wardrop, 2010).

2.3.4 Anemia

A principal consequência da mielossupressão em gatos acometidos com FeLV é a anemia (Hartmann, 2012a). A infecção por FeLV é a causa mais comum de anemia em gatos, sendo a maioria arregenerativas e associadas ao tropismo do vírus pelas células progenitoras eritróides causando hipoplasia eritróide (ou aplasia medular), ou destruição medular associada à mielofibrose e mielofitose (que ocorrem concomitantemente às mielodisplasias e leucemias), podendo ocorrer ainda pela indisponibilização do ferro para eritropoiese caracterizando uma anemia da doença inflamatória (Linenberger e Abkowitz, 1995; Shimoda et al., 2000; Hisasue et al., 2001). Foi excluído como causa da anemia a deficiência de eritropoietina em animais infectados (Kociba et al., 1983). O envolvimento da medula óssea em neoplasias linfóides com mielofitose e mielofibrose, desordens mielodisplásicas e deficiências nutricionais fazem um importante papel no desenvolvimento de anemia não-regenerativa ou trombocitopenia em gatos com FeLV progressor (Shimoda et al., 2000; Hisasue et al., 2001).

O mielograma de felinos infectados com FeLV demonstrou a diminuição intensa de precursores das células eritróides com impedimento de diferenciação dessas células nesses animais com linhagens mielóides e megacariocíticas normais e aumento da relação mielóide:eritróide, levando anemia intensa e podendo apresentar macrocitose (anemia macrocítica) e diminuição de reticulócitos (Kociba, 1986; Quigley et al., 2000).

Displasias eritróides (deseritropoiese) como macrocitose ou megalocitose, com presença de células megaloblásticas podem ser encontrados em animais infectados pelo FeLV (Grindem et al., 2014). A presença de macrocitose em sangue periférico na ausência de reticulocitose foi observada em animais anêmicos infectados pelo FeLV,

sendo uma das alterações mais comuns, caracterizando-se como SMD e revela o aspecto da eritropoiese ineficiente provocada pela ação do vírus na medula (Duda et al., 2020).

As anemias regenerativas podem ocorrer em até 10% dos casos de FeLV devido à hemólise (anemia hemolítica imunomediada), que pode resultar também em acometimento da linhagem megacariocítica, com risco de hemorragia (Shelton e Linenberger, 1995). Os animais infectados pelo FeLV estão predispostos à infecção clínica por *Mycoplasma haemofelis*, e ambos os agentes aumentam o risco de anemia hemolítica imunomediada aguda (Weiss e Wardrop, 2010). A anemia hemolítica imunomediada pode ser observada em gatos com FeLV, sendo regenerativa em casos de infecção pelos subtipos A e B.

Em um estudo realizado por Costa et al. (2017) 31,0% dos 153 felinos com antigenemia persistente para FeLV apresentaram anemia, sendo 56% regenerativas considerando a contagem de reticulócitos agregados, resultado muito similar ao encontrado por Gleich e Hartmann (2009) que observaram anemia em 42% dos animais persistentemente virêmicos.

O FeLV dos subtipos A e C infectam as três linhagens celulares na medula óssea, mas apenas o subtipo C destrói os precursores eritróides. A aplasia da linhagem de células vermelhas na medula óssea pode ocorrer com a infecção pelo subtipo C do FeLV, tendo como causa mais provável a inibição dos eritrócitos progenitores e não por outras causas como situações de destruição imunomediada, que ocorrem menos comumente (Weiss e Wardrop, 2010). A associação entre o FeLV A e C aumentam as chances dos animais apresentarem anemia (Jarret et al., 1984). Um relato de caso publicado nos Estados Unidos demonstrou aplasia de células precursoras eritróides e mielofibrose em grau moderado, através de avaliação histopatológica em um felino infectado por FeLV, nenhuma célula precursora foi encontrada e o animal apresentava anemia intensa (Southard et al., 2016).

Dentre as diferentes cepas do vírus da FeLV, a Kawakami-Theilen com os subtipos A, B e C causam anemia intensa com hipoplasia eritróide apenas em gatos recém-nascidos (Rojko e Olsen, 1984), mas em outro estudo que utilizou outra cepa a hipoplasia

eritróide foi observada associada com anemia arregenerativa na presença dos subtipos A e C em filhotes e animais adultos (Jarret et al., 1984).

2.3.5 Alterações em plaquetas

O vírus da leucemia felina pode ter ação direta na diminuição da contagem de megacariócitos na medula óssea e plaquetas por serem alvos para a replicação viral. Também pode ocorrer trombocitopenia imunomediada associada à anemia em animais geralmente assintomáticos (Brown e Rogers, 2001).

A supressão da medula óssea induzida pelo FeLV e a infiltração de células neoplásicas nos casos de leucemia podem diminuir a quantidade de megacariócitos com consequente trombocitopenia (Hartmann, 2012).

Podem ocorrer disfunções plaquetárias em consequência da infecção devido a reprodução do FeLV nessas estruturas, produzindo plaquetas afuncionais ou gigantes (Shelton e Linenberger, 1995).

2.3.6 Alterações em leucócitos

A replicação viral em células precursoras mielóides pode desencadear diversas alterações, dentre elas neutropenia é a principal, mas também podem ocorrer alterações na maturação das células com aprisionamento de meta-mielócitos e mielócitos em algumas fases. Foi considerada causa imunomediada por resposta ao tratamento em casos de neutropenia em gatos infectados pelo FeLV (Hartmann, 2012a).

A leucopenia pode ser encontrada em 50% dos animais que apresentam doenças relacionadas ao FeLV, sendo neutropenia sem alterações na medula óssea, a forma mais comum (Weiss e Wardrop, 2010). Um ciclo de hipoplasia seguida de hiperplasia neutrofílica pode ser encontrado em gatos infectados (Swenson et al., 1987). A neutropenia associada à linfopenia predispõe infecções secundárias aumentando o risco de comorbidades associadas ao FeLV (Duda et al., 2020).

A linfopenia é comumente associada a animais infectados pelo FeLV com depleção de órgãos linfóides e medula óssea, sendo consequência de depleções ou atrofia de núcleos

produtores de linfócitos, principalmente linfócitos-T (Quakenbush et al, 1990). Essa linfopenia independe da carga viral presente no animal (Duda et al., 2020).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Gatos com o FeLV apresentam alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e imunofenotípicas variáveis de acordo com o *status* da infecção (regressiva ou progressiva).

3.2 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações clínicas e laboratoriais em gatos conforme o status de infecção pelo FeLV, determinado pelo teste antigênico e PCR.

3.3 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas, de medula óssea e linfonodos em gatos infectados pelo FeLV.
- Correlacionar as alterações laboratoriais com as alterações clínicas apresentadas pelos pacientes examinados.
- Comparar as alterações laboratoriais com o status de infecção pelo FeLV.
- Avaliar imunofenotipagem de sangue e linfonodo de gatos que apresentam diferentes formas da infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais

Participaram desse estudo 49 gatos de raças e idades variadas, sem sintomas clínicos relacionados ao FeLV, incluídos no programa de esterilização cirúrgica da Organização Não Governamental Bichos Gerais, localizada em Belo Horizonte, MG.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) com protocolo nº 122/2020 (Anexo 1). Para participação no estudo os responsáveis pelos animais assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Anexo 2) atestando ciência dos termos do estudo e autorizando a participação.

Todos os procedimentos, incluindo exame clínico, coleta de amostras biológicas e esterilização cirúrgica foram realizados no mesmo dia.

4.2 Exame clínico

Todos os gatos foram submetidos a um exame clínico completo, envolvendo identificação do paciente (raça, idade, sexo, *status* reprodutivo), anamnese e histórico detalhados. Foram registradas as informações referentes à infestação por pulgas e carrapatos, e ainda a existência de qualquer queixa relacionada a saúde e comportamento do animal, doenças e tratamentos anteriores, bem como qualidade das fezes e urina.

O exame físico foi conduzido conforme a seguinte sequência semiológica:

- Inspeção à distância: avaliação da condição física, condição corporal, alterações anatômicas, postura, nível de consciência (alerta, depressivo, obnubilado, comatoso) e comportamento (dócil, agressivo, medroso).
- Avaliação dos parâmetros gerais: temperatura corporal, tempo de preenchimento capilar, frequência cardíaca, frequência respiratória.
- Avaliação das mucosas e linfonodos.
- Palpação abdominal.
- Auscultação torácica e cardíaca.

4.3 Sedação e anestesia

Após exame físico realizou-se a sedação dos animais com a administração, pela via intramuscular, de xilazina 2% (0,25 mg/kg), cetamina 10% (8 mg/kg) e midazolam 0,5% 5mg/ml (0,25mg/kg). Após 10 minutos realizou-se a tricotomia dos machos na região escrotal e das fêmeas, na região paracostal direita. Realizou-se o esvaziamento da bexiga por expressão manual e a colocação do acesso venoso na veia cefálica. A indução

anestésica foi realizada, pela via intravenosa, utilizando propofol 1% (3mg/kg) e fentanil 50 mcg/mL (1 mcg/kg). As fêmeas foram submetidas à intubação orotraqueal para fornecimento de oxigênio no transcirúrgico. Realizou-se a antisepsia com iodopovidona 1% e álcool 70% para a realização da ovariohisterectomia via paracostal, utilizando lacre, ou orquiectomia escrotal, pela técnica fechada com ligadura utilizando o próprio pedículo testicular.

4.4 Coleta

Após a cirurgia, aproximadamente 3,0ml de sangue, foram obtidos a partir de punção da veia jugular ou cefálica, e armazenados, sob refrigeração, por no máximo 12 horas, em microtubos estéreis contendo EDTA e tubos estéreis contendo ativador de coagulação. Após as análises hematológicas e bioquímicas as amostras de sangue total foram congeladas para realização do diagnóstico molecular.

A punção de medula óssea, foi realizada no úmero, após antisepsia com clorexidinedegermante 2% e álcool 70%, utilizando agulha 40x12cm e cateter 20, como mandril, e seringa de 10mL, contendo EDTA, para aspiração. O material obtido foi depositado em placa de petri para coleta das espículas com tubo capilar e colocadas em lâmina de vidro, para a realização do “squash”. Após a secagem do material, foi utilizada a coloração de Romanowski (Panótico¹) com posterior avaliação em microscopia óptica.

Linfonodo poplíteo foi puncionado com agulha fina. O material obtido foi depositado em lâmina de vidro, para a realização do “squash”. Após a secagem do material, foi utilizada a coloração de Romanowski (panótico) com posterior avaliação em microscopia óptica.

4.5 Processamento das amostras

4.5.1 Diagnóstico do status da infecção pelo FeLV

O teste SNAP FIV/FeLV Combo (Idexx)² foi utilizado para o diagnóstico da viremia pelo FeLV (antígeno p27) e detecção de anticorpos relacionados ao FIV, a partir de amostras

¹Panótico Rápido LB®, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil.

² SNAP FIV/FeLV Combo, Idexx, Westbrook, Maine USA

de soro, obtidas após centrifugação do sangue total. Gatos reagentes no teste rápido foram automaticamente considerados como animais infectados, na forma progressiva.

A técnica da PCR foi aplicada para o diagnóstico molecular do FeLV, nas amostras de sangue e medula óssea de todos os animais, independente do resultado no teste rápido. Foram considerados animais infectados, na forma regressiva, aqueles que apresentarem resultado negativo no teste rápido, mas positivo na PCR. Animais não infectados ou abortivos foram aqueles negativos para o FeLV, nos dois métodos diagnósticos utilizados (Hartmann, 2012).

O DNA das amostras de sangue e medula óssea congeladas foi extraído através do reagente para purificação de DNA (Genelute Kit para Preparação de DNA Genômico de Mamíferos) conforme manual do fabricante. Como controle da extração de DNA, foi realizado o PCR do fragmento de gene GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), presente em todos os mamíferos. Os *primers* utilizados foram 5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTA-3' (*forward*) e 3'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-5' (*reverse*). O volume final de cada reação consistiu em 25µL, sendo 5 µL de 5xGreen GoTaqFlexi Buffer (PROMEGA, USA), 1,5µl de MgCl₂, 1,0µL de cada *primer* (10pmol/µL, Invitrogen, USA), 0,5µL de dNTP (10mM, PROMEGA, USA), 0,2 µL de GoTaqPlimerase (500U, PROMEGA, USA) e 13,8 µL de água ultrapura, livre de RNase e DNase. A essa mistura adicionou-se 2,0µL do DNA. O produto final foi submetido ao ciclo de replicação com desnaturação a 95°C, durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos contendo 30 segundos à 95°C (desnaturação), 30 segundos à 54°C (anelamento) e, por 40 segundos à 72°C (extensão) em cada ciclo. Para a amplificação final o ciclo é complementado por sete minutos à 72°C. Após a replicação o produto é aplicado ao gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo e visualizado na luz ultravioleta. O tamanho do produto amplificado é de 709 pb, sendo que todos os animais e amostras necessariamente demonstram resultados positivos para a realização do PCR para FeLV.

O diagnóstico molecular para identificação do FeLV foi realizado através da nestedPCR padronizado por Bande e colaboradores (2014). As duas reações são compostas dos mesmos volumes de reagente sendo 5,1µL de 5xGreen GoTaqFlexi Buffer (Promega, USA), 1,5µL de MgCl₂, 1,5µL de cada primer (10pmol/µL, Invitrogen, USA), 0,5µL de

dNTP (10mM, PROMEGA, USA), 0,25µL de GoTaq Polimerase (500U, PROMEGA, USA) e 9,65µL de água ultrapuralivre de RNase e DNase. A esse produto adiciona-se 2µL de DNA para a primeira reação e do material amplificado na segunda reação. Os primers utilizados em conjunto amplificam parte do gene *gag* com o segmento FeLV-U3LTR e são 5'-ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC-3' e 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3' e para a segunda reação 5'-GCTCCCCAGTTGACCAGAGT-3' e reverse (5'-GCTTCGGTACCAAACCGAAA-3'. A mistura contendo os iniciadores para FeLV foi submetida ao seguinte ciclo no termociclador: 94°C por dois minutos (desnaturação inicial), 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por um minuto (extensão), e, finalmente, 72°C por dez minutos (amplificação).

A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 10µL de cada solução após segunda amplificação, resulta na identificação de produto de 601pb para o FeLV. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações realizadas.

4.5.2 Hemograma

O hemograma foi realizado, a partir do sangue armazenado em tubos contendo EDTA, em analisador hematológico veterinário. O aparelho nos fornece diversos valores como o total de leucócitos, volume globular, concentração de hemácias por µL de sangue, hemoglobina, VCM, CHCM, HCM, RDW e concentração de plaquetas. Foi realizado também o volume globular para comparação através do método utilizando o micro-hematócrito com o sangue do animal colocado em uma centrífuga por 5 minutos à 10000 rpm. A contagem total de leucócitos e plaquetas foi conferida em lâmina, durante a realização da contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica das células, realizada em microscopia óptica, em aumentos de 200 e 1000x, utilizando esfregaços sanguíneos corados em panótico.

4.5.3 Perfil bioquímico

O perfil bioquímico foi realizado, a partir do sangue armazenado em tubos contendo ativador de coagulação, em analisador bioquímico Cobas Mira³. As análises bioquímicas incluíram proteínas totais, albumina, globulinas, alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina e amilase.

4.5.4 Avaliação citológica da medula óssea (mielograma)

As lâminas de medula óssea foram submetidas à secagem ao ar e posteriormente coradas com panótico para avaliação em microscopia óptica, em aumentos de 200 e 1000x. O exame citológico (mielograma) iniciou-se com a identificação macroscópica de espículas ou partículas na lâmina, que em quantidade inadequada indicam hipocelularidade, coleta malsucedida ou dificuldade na realização da lâmina. Amostras adequadas foram avaliadas quanto à celularidade (relação células/gordura), concentração de megacariócitos e reservas de ferro. A contagem diferencial dos tipos celulares foi realizada em 500 células e incluiu a avaliação detalhada da morfologia celular e presença de microrganismos. Em seguida foi calculada a relação mielóide:eritróide.

4.5.5 Avaliação citológica dos linfonodos

As lâminas de linfonodo foram submetidas à secagem ao ar e posteriormente coradas com panótico para avaliação em microscopia óptica em aumentos de 200 e 1000x. A interpretação citológica baseou na proporção e nas características morfológicas dos diferentes tipos celulares em relação aos padrões de normalidade estabelecidos para a espécie felina.

4.5.6 Avaliação do perfil fenotípico do linfonodo e sangue

Para o processamento de imunofenotipagem dos linfonodos, os mesmos foram coletados e armazenados por até 12 horas no próprio “canhão” da agulha utilizada e foram transferidos com o auxílio de 200µL de PBS para um tubo eppendorf. Essa amostra, por se tratar de um tecido coletado foi filtrada em um “CellStream” para retirar qualquer

³ Analisador Bioquímico Cobas Mira, Roche, São Paulo, São Paulo, Brasil.

tecido íntegro ou componente que pudesse prejudicar a análise. O material filtrado foi utilizado no processamento para imunofenotipagem.

Os anticorpos utilizados foram testados para utilização em felinos e, de acordo com resultados satisfatórios os mesmos foram determinados para uso no experimento. Para incubação dos anticorpos detalhados no quadro 2 foi adicionado 50 µLram a 50µL da solução contendo material de linfonodo ou 50µL de sangue, em um tubo de poliestireno 5 mL (BD Falcon Round-Botton Tube Polystyrene). O tubo que apresentava as marcações CD3/4/8 passou por um processo de permeabilização celular no qual foi adicionado 3 mL de PBS-P (solução de saponina), com incubação por 10 minutos, seguido de centrifugação por 7 minutos 1800rpm e 18°C para recuperação do sobrenadante, permitindo que a amostra fosse processada da mesma forma que os outros tubos. Por serem flourocromos diferentes foi possível realizar as marcações em três tubos agrupando da seguinte forma: CD3, CD4 e CD8; CD14 e CD21. Sempre que possível era adicionada amostra em um tubo de célula sem marcação de anticorpos como forma de controle negativo para as reações. A solução de amostra com anticorpo foi homogeneizada em vórtex e incubada à temperatura ambiente, protegida da luz por 30 minutos.

Quadro 2: Anticorpos utilizados e a respectiva célula marcada na reação.

Anticorpo	Célula Marcada
Mouse anti-Cat CD8 Alpha/Beta Clone vpg9 (PE)	Células T citotóxicas
RAT ANTI-HUMAN CD3 Clone CD3-12 (APC)	Células T
Mouse anti-Cat CD4: FITC Clone vpg 34 (FITC)	Células T auxiliares
Mouse anti-Human CD14 Clone TUK4 (APC)	Monócitos
Mouse anti-Canine CD21 Clone ca2.1d6 (PE)	Células B

Após a incubação, 2 mL de solução de lise *Billingdog* (Facslysesolution – Becton Dickinson, San Jose, EUA) foram adicionados seguidos de homogeneização e incubação por 10 minutos, sempre ao abrigo da luz. Foi adicionado 1 mL de PBS-Wash (pH 7,2, 0,015 M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1 % de azida sódica) para interromper a reação de lise e a solução era centrifugada (600 G por 7 minutos à 18°C). Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e a solução foi ressuspensa com 2 mL de PBS-Wash, realizou outra centrifugação e descarte do sobrenadante seguido de ressuspensão do pellet com 200µL de solução fixadora MacsFacsFix (10,0 g/L

paraformaldeído, 10,2 g/L cacodilato de sódio e 6,65 g/L cloreto de sódio) para se realizar a leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, EUA).

Para aquisição dos dados em gráficos foram obtidos 30000 eventos por amostras e a imunofenotipagem celular foi analisada, utilizando o software FlowJo 10.4 (Tree Star, Ashland, OR, EUA)

4.5.7 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que cada animal representou uma unidade experimental ou repetição.

A prevalência do FeLV, nos dois métodos diagnósticos e, as alterações clínicas e de patologia clínica foram descritas em planilha de Excel. Realizou-se a descrição com mediana, média e desvio-padrão para cada analito conforme o resultado para FeLV nos dois métodos diagnósticos, sendo FeLV negativo, FeLV regressor (positivo apenas no PCR) e FeLV progressor (positivo no PCR e teste antigênico)

Para a estatística inferencial o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade das variáveis paramétricas. O teste de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre o status FeLV (negativo ou positivo) e os parâmetros analisados. Os gatos foram divididos em apenas dois grupos, sendo não-infectado/atípico/abortivo (FeLV não detectado - negativo), e progressor/regressor (FeLV detectado pelo teste antigênico e/ou PCR - positivo) para comparação da média (dados paramétricos com distribuição normal) ou mediana (dados não paramétricos ou com distribuição não normal) pelo teste t de student e Mann-Whitney, respectivamente. O número de animais, em cada grupo, foi baseado no estudo de Jain (1993), com estabelecimento dos parâmetros de referência na medula óssea de gatos (n = 7).

Para maiores análises, grupo de animais positivos foi estratificado em progressores e regressores, sendo o teste t de student substituído pela ANOVA *ad-hoc* Dunns e o de Mann-Whitney por Kruskal-Wallis *ad-hoc* Dunns.

5. RESULTADOS

Dos 49 gatos incluídos neste estudo, o FeLV não foi encontrado em 39 espécimes (79,6%), caracterizados como não-infectado/atípico/abortivo (negativo). Nos demais animais, seis (12,2%) foram diagnosticados como positivos para FeLV do subtipo progressor, a partir da identificação do antígeno viral em amostras de soroe do DNA proviralem amostras de medula óssea, sendo que apenas em um o DNA proviral foi detectado apenas no sangue. Os quatro animais restantes (8,2%) foram diagnosticados como positivos para FeLV do subtipo regressor, a partir da presença do DNA proviral em sangue e medula óssea de dois deles, apenas no sangue em um e apenas na medula óssea no outro animal regressor.

Dessa forma, a prevalência de FeLV na população foi de 20,4% (10/49), sendo 40,0% (4/10) na forma regressiva e 60,0% (6/10) na forma progressiva.

Dos 49 gatos, todos foram considerados misturas de raças. Em 27 animais foi estimada a idade, que variou de quatro a 24 meses ($8,6 \pm 5,9$ meses). Em relação ao gênero, foram 14 machos e 35 fêmeas, todos inteiros, a serem submetidos à esterilização cirúrgica (orquiectomia escrotal fechada e ovariectomia por acesso paracostal, respectivamente). Não houve diferença na idade e proporção de machos e fêmeas de acordo com o status FeLV. A mediana do escore corporal foi 4 e não diferiu entre os grupos. Em relação ao exame físico todos os gatos apresentaram a temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória dentro do intervalo de referência e não houve diferença entre os grupos. Apenas um gato, do grupo FeLV-negativo, apresentou alteração na coloração da mucosa, que estava discretamente hipercorada. Linfadenomegalia periférica (variando de discreta a moderada) foi identificada em 30,6% (15/49) dos gatos e ectoparasitas da espécie *Ctenocephalides felis* foram identificados em 16,3% (8/49) dos animais.

Os resultados da bioquímica sérica, hemograma e imunofenotipagem que apresentaram significância estatística entre os grupos negativos e positivos (considerando animais regressores e progressores somados) estão expostos na tabela 1 e discutidos ao longo de cada item no texto.

5.1 Perfil bioquímico

Nas análises bioquímicas ocorreu maior concentração média de proteína total ($p = 0,0105$) nos animais positivos para a infecção por FeLV (regressores e progressores) quando comparados ao grupo negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Análise estatística significativa comparando gatos dos grupos negativo e positivo (regressores somados aos progressores) em relação à infecção por FeLV.

	FeLV-			FeLV+			Spearman		t de Student (p)**	Mann-Whitney (p)**
	Média	Mediana	D.P.*	Média	Mediana	D.P.	p	r _s		
Creatinina(mg/dL)	0,9	0,8 (a)	0,4	0,6	0,5 (b)	0,3	0,025	0,322	-	0,0259
Proteínas Totais (g/dL)	6,7 (a)	6,7	0,6	7,2 (b)	7,3	0,6	0,016	0,344	0,0105	-
VCM(fL)	41,0	42,1 (a)	5,2	46,5	47,7 (b)	4,8	0,004	0,404	-	0,0046
CHCM(g/dL)	36,0 (a)	35,6	2,9	33,3 (b)	31,8	3,7	0,009	0,372	0,0192	
CD14 ⁺ (sangue)	0,7	0,6 (a)	0,7	1,9	1,5 (b)	1,5	0,017	0,474	-	0,0204

*DP: Desvio padrão

**Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença com $p < 0,05$.

A mediana, média e desvio padrão dos resultados dos testes de bioquímica sérica dos três grupos estudados estão expostos na tabela 2.

Valores acima da referência para ALT foram observados em 12% dos gatos negativos (5/39) e 33,3% dos infectados de forma progressiva (2/6), nenhum animal infectado de forma regressiva apresentou aumento na atividade desta enzima. A média nos animais negativos foi de 83,2 U/L. A média observada nos animais positivos para FeLV esteve dentro do intervalo de referência para espécie e com baixo desvio padrão. Entretanto, os dados não apresentaram distribuição normal e para efeito de comparação utilizou-se a mediana, sendo 54,4 U/L para o grupo FeLV-negativo, 43,6 U/L no grupo regressor e 66,9 U/L no grupo progressor (Kruskal-Wallis *ad-hoc* Dunns, $p = 0,1729$).

Nos animais positivos para FeLV, 30% (3/10) apresentaram valores abaixo da referência para a espécie e o mesmo percentual para valores acima da referência, sendo que no grupo FeLV-negativo, houve valores acima e abaixo da referência em 15,4% (6/39) e 17,9% (7/39), respectivamente.

Em 30% dos gatos FeLV-positivos (regressores e progressores) foram observados valores discretamente acima da referência para uréia, com média de 55,42 mg/dL nos animais progressivos e 57,45 mg/dL nos regressivos e 49,68 mg/dL nos gatos FeLV-negativos (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,1699$). Nos gatos negativos para FeLV, 17,9% (7/39) apresentaram aumento desse analito e 12% (5/39) diminuição em relação aos valores de referência. Nenhum animal apresentou valores acima da referência de forma expressiva para esse analito.

Os gatos FeLV-positivos apresentaram menor média para os valores de creatinina (0,64 mg/dL; sendo 0,58 no grupo regressor e 0,69 mg/dL no grupo progressor) que os animais negativos (0,87 mg/dL) (Mann-Whitney, $p = 0,0259$) mas não houve diferença quando os gatos regressores foram separados dos progressores (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,1676$). A creatinina estava diminuída em 46,1% (18/39) dos animais pertencentes ao grupo negativo para FeLV, enquanto 66,6% (4/6) dos animais progressores e 75% (3/4) dos animais regressores apresentaram a mesma alteração nesse analito.

Tabela 2: Média, mediana e desvio padrão dos resultados do perfil bioquímico de gatos negativos, regressores e progressores para FeLV.

Variável	FeLV- (n = 39)		FeLV Regressor (n = 4)		FeLVProgressor (n=6)		Valor de referênci a*	Estatística**
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P		
Proteínas Totais (g/dL)	6,7	6,7 ±0,56	7,7	7,4 ±0,79	7,1	7,1 ±0,39	5,4-7,8	ANOVA + Tukey (p = 0,1699)
Albumina (g/dL)	3,2	3,2 ±0,32	3,3	3,3 ±0,19	3,3	3,3 ±0,29	2,1-3,3	ANOVA + Tukey (p = 0,5077)
Globulinas (g/dL)	3,5	3,5 ±0,54	4,4	4,1 ±0,97	3,9	3,8 ±0,42	2,6-5,1	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,1234)
Relação albumina / globulina	0,91	0,92 ±0,17	0,75	0,87 ±0,31	0,84	0,88 ±0,17		ANOVA + Tukey (p = 0,8033)
Glicose (g/dL)	115,9	145,4 ±73,9	131,0	140,7 ±53,4	169,2	168,3 ±41,4	73-134	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,4498)
ALT (UI)	54,4	83,2 ±147,3	43,6	48,7 ±20,6	66,9	75,2 ±26,6	6-83	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,1729)
AST (UI)	30,5	37,8 ±27,2	29,5	31,6 ±9,9	37,9	37,0 ±24,7	23-43	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,8944)
Fosfatase Alcalina (UI)	80,51	83,4 ±58,5	40,7	40,7 ±29,7	93,5	95,7 ±63,4	25-93	ANOVA + Tukey (p = 0,6042)
LDH (UI)	240,4	276,2 ± 127,5	235,3	264,0 ±153,2	333,8	411,0 ±166,6	63-273	ANOVA + Tukey (p = 0,1140)
Amilase (UI)	1234,6	1561,8 ±706,8	1291,3	1466,9 ±766,7	1446,4	1585,8 ±421,9	500-1800	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,5776)
Uréia (mg/d L)	48,37	49,7 ±10,1	56,6	57,5 ±9,74	55,2	55,4 ± 6,4	40-60	ANOVA + Tukey (p = 0,4341)
Creatinina (mg/dL)	0,82	0,9 ±0,34	0,52	0,58 ±0,15	0,57	0,68 ± 0,33	0,8-1,8	ANOVA + Tukey (p = 0,1676)

ALT – alanina transaminase, AST – aspartato transaminase, LDH – lactato desidrogenase.

*Valores de referência utilizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

**Não foi observada diferença significativa entre os grupos (p ≥0,05) em todas as variáveis.

D.P = Desvio-padrão

5.2 Hemograma

Os resultados de mediana, média e desvio-padrão das variáveis do eritrograma dos grupos estão expostos na tabela 3. Nos índices eritrocitários (contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito), não foi observada diferença significativa entre os grupos, sendo que apenas 2,0% (3/49) dos gatos, todos do grupo FeLV negativo, apresentaram anemia discreta, normocítica normocrômica, todos sem aumento na contagem de reticulócitos agregados em nenhum dos pacientes avaliados. Nos índices eritrocitários (VCM, CHCM e RDW), apesar de não ter sido verificada diferença

entre os três grupos, animais considerados positivos para FeLV (infecção regressiva e progressiva) apresentaram média menor e mediana maior do que os gatos FeLV-negativos, para CHCM (33,29 vs. 35,96; “t” de student, $p = 0,00192$) e VCM(35,60 vs. 31,81; Mann-Whitney, $p = 0,0046$), respectivamente.

Tabela 3: Valores de mediana, média e desvio padrão do eritrograma de gatos negativos e infectados de forma regressiva e progressiva para FeLV.

	FeLV negativo (n = 39)		FeLV Regressor (n = 4)		FeLV Progressor (n = 6)		Valor de referência	Estatística
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P		
Hematócrito(%)	30,5	30,1(a) ±4,5	32,5	32,3 (a) ±3,3	32	31,2(a) ±6,21	24-45	ANOVA + Tukey ($p = 0,6146$)
Eritrócitos (x 10⁶ céls/μL)	7,1	7,2 (a) ±0,8	7,3	7,0 (a) ±0,73	6,8	6,7(a) ±1,39	5-10	ANOVA + Tukey ($p = 0,5076$)
Hemoglobina (g/dL)	10,8	10,8 (a) ±1,2	11,3	10,6 (a) ±1,59	10,9	10,4(a) ±1,7	8-15	ANOVA + Tukey ($p = 0,7839$)
HCM (g/dL)	14,7 (a)	15,0 ± 0,8	15,3 (a)	15,0 ±0,81	15,6 (a)	15,6 ±1,16	12,5-17,5	Kruskal- Wallis + Dunns ($p = 0,4794$)
VCM (fL)	42,1 (a)	41,0 ± 5,2	45,7 (a)	46,2 ±3,21	47,7 (a)	46,7 ±5,86	39-55	Kruskal- Wallis + Dunns ($p = 0,0202$)**
CHCM (g/dL)	35,6	36,0 (a) ±2,9	33,1	32,7 (a) ±3,01	31,8	33,7(a) ±4,36	30-36	ANOVA + Tukey ($p = 0,0591$)**
RDW (%)	14,6	14,6 (a) ±0,9	15,3	15,1 (a) ±1,22	15,3	15,5(a) ±0,88	12-17	ANOVA + Tukey ($p = 0,0662$)

HCM – hemoglobina corpuscular média; VCM – volume corpuscular médio, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW – “redcell distribution width”

*Valores de referência utilizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

** Diferença identificada entre negativos e positivos (regressores + progressores).

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença com $p < 0,05$.

D.P = Desvio-padrão

Os resultados de mediana, média e desvio-padrão relacionados ao leucograma se encontram na tabela 4. Foi observado leucocitose em 10,2% (4/39) dos animais negativos para FeLV e em 50% dos animais com infecção regressiva pelo FeLV (2/4). Sendo todos acompanhados de neutrofilia sem desvio. Linfopenia foi identificada em 17,9% (7/39) dos gatos negativos para FeLV mas nenhum dos animais infectados apresentou essa

alteração. Não ocorreram alterações na contagem de leucócitos totais em animais com infecção progressiva.

Eosinofilia e basofilia foram alterações encontradas em 14,2% (7/49) e 12,2% (6/49) dos animais respectivamente. Um dos animais com aumento na concentração de eosinófilos estava no grupo de animais progressores e 2 no grupo dos regressores, enquanto a basofilia foi observada em 5 animais negativos e 2 regressores.

Nenhum animal apresentou aumento de bastonetes ou outras células precursoras no sangue periférico.

A frequência das alterações morfológicas observada em cada grupo está na tabela 5.

Tabela 4: Valores de mediana, média e desvio padrão do leucograma dos grupos de gatos negativo, regressor e progressor para FeLV.

	FeLV- (n = 39)		FeLV Regressor (n = 4)		FeLVProgressor (n = 6)		Valor de referência*	Estatística
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P		
Leucócitos totais (cél/μL)	10925	12263,2 (a) ±5571,7	19375	18662,5 (a) ±6286,7	13500	12958,3(a) ±2898	5500-19500	ANOVA + Tukey (p = 0,0895)
Segmentados (cél/μL)	6597,5	7855,6 (a) ±5298,4	13630	14230,8 (a) ±6651,3	8221,5	7819,8 (a) ±1453,7	2500-12500	ANOVA + Tukey (p = 0,0689)
Monócitos (cél/μL)	162	257,0 (a) ±270,3	193,8	250,4(a) ±178,4	391	523,7(a) ±406,56	0-850	ANOVA + Tukey (p = 0,1091)
Linfócitos (cél/μL)	3037,3	3403,67(a) ±1829,3	2216,5	2631,4 (a) ±1377,1	3441,5	3720,7(a) ±2299,06	1500-7000	ANOVA + Tukey (p = 0,6551)
Eosinófilos (cél/μL)	522	687,42(a) ±625,8	1484,5	1394,8 (a) ±531,4	360	827,6(a) ±1104,46	0-1500	ANOVA + Tukey (p = 0,1570)
Basófilos (cél/μL)	0 (a)	17,8 ±59,7	102,5 (a)	103,3±119,2	0 (a)	0	Raros	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,0505)
Bastonetes (cél/μL)	0 (a)	10,3 ±45,7	0 (a)	0	0 (a)	66,6±118,5	0-300	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,0548)

*Valores de referência utilizados no laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG.

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença com p <0,05.

D.P= Desvio-padrão

Quadro 3: Frequência de alterações morfológicas em leucócitos de gatos pertencentes a cada grupo estudado para infecção pelo FeLV.

Alteração	FeLV- (n = 39)	FeLV Regressor (n = 4)	FeLVProgressor (n = 6)
Linfócitos reativos	48,71%	0%	50%
Monócitos ativados	12,82%	25%	33,33%
Neutrófilos tóxicos	15,38%	0%	0%
Neutrófilos hipersegmentados	17,94%	25%	0%

A trombocitopenia foi observada em 51,2% (25/49) dos animais estudados sendo 84% desses no grupo dos animais não-infectados. Nos animais infectados de forma progressiva e regressiva, 50% (3/6) e 25% (1/4), respectivamente, apresentaram diminuição na contagem das plaquetas.

A ocorrência de microagregados e agregados plaquetários foi elevada, sendo 69,3% (34/49) e 14,2% (7/49), respectivamente. Nos casos de formação de microagregados de forma moderada ou intensa e agregados a contagem fornecida pelo analisador hematológico era a considerada correspondendo a 61,7% (21%) dos casos em que essas alterações ocorreram.

A imunofenotipagem dos leucócitos circulantes foi realizada em sangue total. As análises de linfócitos T CD3+CD4+, linfócitos T CD3+CD8+, linfócitos B CD21+ e monócitos CD14+ foram realizadas para avaliar mudanças nos perfis de subpopulações de linfócitos totais e de monócitos.

As amostras de sangue nas quais foi realizada a imunofenotipagem foram um total de 26, sendo 17 de animais negativos, seis progressores e três regressores.

Foram avaliados dois *gates* celulares para marcação de linfócitos. Os resultados demonstrados na figura 1 correspondem ao *gate* usual nos quais tamanho e granulosidade estão compatíveis com linfócitos.

A concentração média de linfócitos observada nesse *gate* foi de 10,7%, 12,7% e 13,8% nos grupos negativo, regressor e progressor, respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,7332$). A proporção de linfócitos T auxiliares (CD3/4+) foi maior no grupo regressor, representando 25,7% dos linfócitos, enquanto os gatos progressores apresentaram menor concentração entre os grupos (17,29%) (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,5402$). Esse padrão ocorreu também para os linfócitos T citotóxicos (CD3/8+), com concentração média de 14,9% e 8,9% dos linfócitos nos grupos regressores e progressores respectivamente, enquanto no grupo negativo observou-se 9,5% desse tipo celular entre os linfócitos (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,3862$). A mediana da relação de linfócitos CD4+/CD8+ foi de 2,096 para animais negativos para a infecção, e 2,044 para os positivos (2,237 para regressores e 1,871 para progressores), com $p = 0,7438$ (Kruskal-Wallis *ad-hoc* Dunns).

Os linfócitos B (CD21+) também apresentaram o mesmo padrão dos linfócitos T em relação à concentração média dessas células nos grupos regressores e progressores, com 24,3% e 17,9%, respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,8370$).

Foi observado aumento significativo na concentração de monócitos no sangue nos gatos FeLV-positivos (forma progressiva e regressiva) em relação aos gatos negativos para a infecção. Na análise descritiva essa diferença também foi observada em relação aos monócitos no grupo de animais infectados progressivamente, apresentando aumento em relação aos outros grupos com resultado de média de 2,4% em relação aos 30000 eventos lidos na análise enquanto os grupos de animais regressores e negativos para a infecção apresentaram 0,69% e 0,73% respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p=0,0204$). Os resultados de média e desvio-padrão dos grupos estudados estão expostos na Tabela 5 e na Figura 1.

Tabela 5: Valores de mediana, média e desvio padrão de imunofenotipagem em sangue de gatos dos grupos negativo, regressor e progressor para infecção por FeLV.

	FeLV- (n = 16)		FeLV Regressor (n = 3)		FeLVProgressor (n = 6)		Valor de referência (%)*	Estatística (ANOVA <i>ad-hoc</i> Tukey)
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P		
% "Gate" Linfócitos	9	10,74±6,74	14	12,71±8	8,78	13,8±12,2	31-89	$p = 0,7332$
% Linfócitos T CD4	20,1	22,85±13,21	21	25,7±11,4	19,25	17,2±8,25	19-49	$p = 0,5402$
% Linfócitos T CD8	8,58	9,58±6,23	17,3	14,5±6,2	8,2	8,9±4,8	6-39	$p = 0,3862$
% Linfócitos B	26,05	21,58±15,24	31,8	24,37±17,8	16,4	17,97±18,1	6-50	$p = 0,8370$
% Monócitos	0,55	0,73±0,71	0,58	0,69±0,5	2,1	2,48±1,5	-	$p=0,0204$

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença com $p < 0,05$.

D.P= Desvio-padrão

*Valores de referência baseados em Tizard (2014).

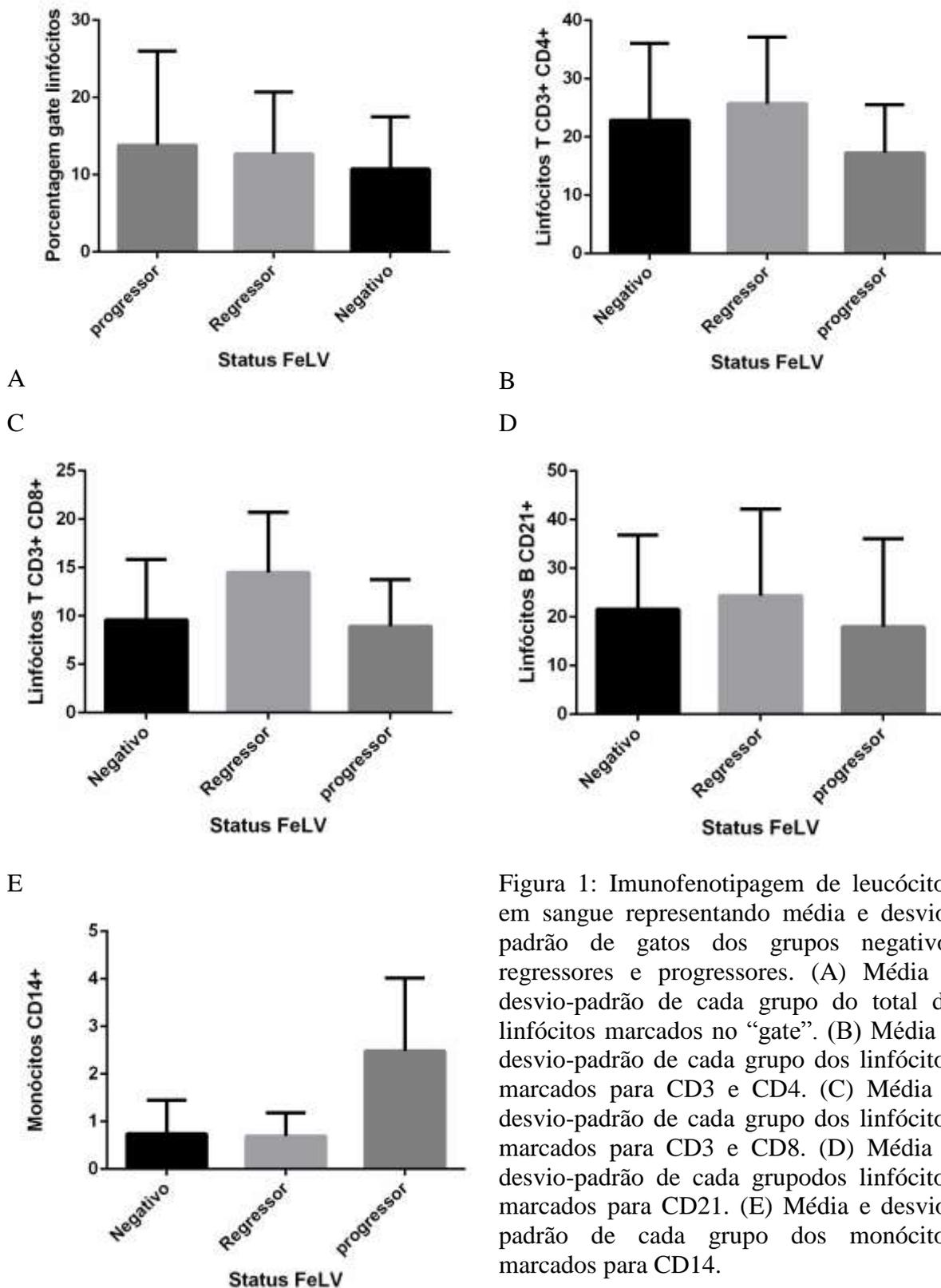


Figura 1: Imunofenotipagem de leucócitos em sangue representando média e desvio-padrão de gatos dos grupos negativo, regressores e progressores. (A) Média e desvio-padrão de cada grupo do total de linfócitos marcados no “gate”. (B) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD4. (C) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD8. (D) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD21. (E) Média e desvio-padrão de cada grupo dos monócitos marcados para CD14.

Outra população analisada foi a população que correspondia a uma concentração celular considerável, com tamanho e granulosidade maiores que linfócitos comuns no sangue e, foram observadas marcações correspondentes à linfócitos nessas células.

Essas células corresponderam a 6,6%, 4,8% e 6,9% dos eventos avaliados nos grupos negativo, regressor e progressor, respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,7079$). Dentre esses eventos foram observadas concentrações médias de 55,0% nos animais negativos, 69,6% no grupo regressor e 34,2% no grupo progressor para células T auxiliares (CD3/4+) (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,7607$). Os linfócitos T citotóxicos (CD3/8+) corresponderam a uma média de 19,6%, 25,1% e 9,0% nos animais negativos para infecção pelo FeLV, regressores e progressores respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,2050$). A concentração de linfócitos B (CD21+) apresentou-se maior nos animais negativos apresentando média de 15,9%, seguida dos animais progressores (14,6%) e regressores (9,8%) (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,8636$).

5.3 Mielograma

Os valores de mediana, média e desvio-padrão dos grupos avaliados relacionados ao mielograma estão expostos na tabela 6. Em dois animais (ambos negativos para FeLV) não foi possível realizar a contagem diferencial na medula óssea e a avaliação de celularidade, enquanto, em quatro animais (três negativos e um regressor) não foi possível realizar a contagem de megacariócitos, sendo assim o número total de avaliações serão de 47 e 45, respectivamente.

Na avaliação da medula óssea, 34,0% (16/47) dos animais apresentaram valores reduzidos na relação mieloide/eritróide, sendo 75% (12/16) desses resultados dentro o grupo dos animais negativos para infecção pelo FeLV. Enquanto houve aumento dessa relação em apenas 10,6% (5/47) dos animais.

A contagem de megacariócitos foi reduzida em 24,3% (9/37) dos animais negativos para FeLV e apenas um (2,7%) animal, também negativo, apresentou aumento nesse tipo celular na avaliação da medula óssea. Não houve alteração nessa contagem no grupo positivo para a infecção.

Tabela 6: Valores de média e desvio padrão de parâmetros observados no mielograma dos animais dos grupos negativos, regressores e progressores para infecções pelo FeLV.

Parâmetro	FeLV – (n=37)		FeLV Regressor (n=4)		FeLV Progressor (n=6)		Estatística
	Média e desvio-padrão	Mediana	Média e desvio-padrão	Mediana	Média e desvio-padrão	Mediana	
Celularidade (%)	58,7 ± 14,0	60 (a)	57,5 ± 18,5	57,5(a)	53,7 ± 30,6	60(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,2666)
Megacariócitos	6,2 ± 3,0	6(a)	6 ± 2,7	5(a)	6,8 ± 1,8	7(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,0733)
Relação M:E	1,4 ± 0,4	1,3(a)	1,6 ± 0,9	1,2(a)	1,3 ± 0,8	1,0(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,5792)
Rubriblasto (%)	1,6 ± 1,0	1,4(a)	1,1 ± 0,2	1,1(a)	1,8 ± 1,3	1,5(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,6657)
Pro-rubricito (%)	1,4 ± 0,6	1,3(a)	0,9 ± 0,2	0,8(a)	3,48 ± 4,4	1,9(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,0375)
Rubricito (%)	26,0 ± 5,3 (a)	25,7	26,3 ± 5,1 (a)	26,9	30,3 ± 9,1 (a)	33,3	ANOVA + Tukey (p = 0,2621)
Metarrubricito (%)	5,3 ± 2,4 (a)	5,1	3,2 ± 2,1 (a)	3,1	7,1 ± 3,9 (a)	6,3	ANOVA + Tukey (p = 0,0827)
Mieloblasto (%)	1,4 ± 0,7	1,2(a)	1,5 ± 1,0	1,4(a)	1,9 ± 1,3	1,9(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,7713)
Pro-mielócito (%)	2,6 ± 1,2	2,3(a)	1,8 ± 1,0	1,9(a)	3,6 ± 1,9	2,95(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,1621)
Mielócito (%)	3,9 ± 1,5 (a)	3,6	2,9 ± 1,5 (a)	3,25	4,4 ± 1,3 (a)	4,8	ANOVA + Tukey (p = 0,2995)
Metamielócito (%)	7,3 ± 2,1 (a)	7,5	7,2 ± 2,5 (a)	6,6	8,0 ± 3,3 (a)	7,1	ANOVA + Tukey (p = 0,7869)
Bastonete (%)	18,3 ± 6,0 (a)	19,1	19,5 ± 4,3 (a)	17,55	14,1 ± 6,4	13,05	ANOVA + Tukey (p = 0,2409)
N. Segmentado (%)	10,7 ± 4,6 (a)	10,9	11,9 ± 7,0 (a)	11,75	10,8 ± 8,8 (a)	7,85	ANOVA + Tukey (p = 0,9129)
Eosinófilo (%)	2,2 ± 1,0 (a)	2,3	1,7 ± 0,4 (a)	1,8	2,7 ± 1,7 (a)	2,1	ANOVA + Tukey (p = 0,3175)
Basófilo (%)	0,2 ± 0,2	0,3(a)	0,2 ± 0,2	0,3(a)	0,1 ± 0,2	0,4(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,5894)
Linfócito (%)	17,7 ± 7,0	18,7(a)	21,1 ± 8,3	20,8(a)	13,2 ± 4,8	12,7(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,1511)
Macrófago (%)	0,3 ± 0,4	0,3(a)	0,3 ± 0,3	0,4(a)	0,2 ± 0,2	0,4(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,8297)
Plasmócito (%)	0,5 ± 0,4	0,6(a)	0,4 ± 0,5	0,4(a)	0,5 ± 0,3	0,5(a)	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,6022)

Na avaliação de precursores eritróides o aumento de rubriblastos ocorreu em 78,3% (29/37), 75% (3/4) e 50% (3/6) dos gatos nos grupos negativo, regressor e progressor, respectivamente. Enquanto a contagem de pró-rubricitos e rubricitos esteve aumentada em relação aos valores utilizados como referência em Jain (1993), 29,7% (1/37) e 24,3% (9/37) nos animais não infectados respectivamente e 66,6% (4/6) nas duas contagens para animais progressores. Todos os animais infectados pelo FeLV na forma progressiva apresentaram aumento na contagem em pelo menos um dos precursores eritróides, sendo que um deles apresentava aumento em todos os tipos precursores, um em três deles (rubriblasto, pró-rubricito e rubricito) e outro em dois (rubriblasto e pró-rubricito) quando comparados aos valores padronizados por Jain (1993).

Observou-se valores acima da referência considerados por Jain (1993) de mieloblastos em 91,4% (43/47) dos animais avaliados, além de um aumento de 65,9% (31/47) na contagem de bastonetes na medula óssea, com aumento nesse tipo celular em todos os animais infectados pela forma regressiva da doença. Diminuição na contagem de bastonetes também foi um achado frequente, ocorrendo em 19,1% (9/47) dos animais, sendo dois no grupo dos animais progressores e sete no grupo dos animais negativos.

Ocorreu aumento na concentração de linfócitos na medula óssea em 37,8% (14/37) dos animais do grupo negativo e 50% (2/4) nos animais regressores para a doença, enquanto animais progressores não apresentaram essa alteração. A diminuição na contagem de linfócitos na medula óssea ocorreu em 29,7% (11/37) dos animais em que não foi detectado o FeLV e 50% (3/6) dos animais progressores, não sendo observada nos animais com infecção regressiva pelo FeLV.

5.4 Avaliação citológica dos linfonodos

Das 49 amostras coletadas em linfonodos a avaliação em lâmina foi possível em 23 amostras, uma vez que, nos demais, não foram observados material de linfonodo e/ou foi visualizada apenas adipócitos e material de gordura ou a amostra não tinha integridade suficiente nas células para sua análise impedindo a contagem diferencial. Desses 23 linfonodos, 13 encontravam-se clinicamente normais, enquanto quatro apresentavam linfadenomegalia discreta, quatro com linfadenomegalia moderada e dois com linfadenomegalia acentuada. Outros quatro animais com linfadenopatia discreta e outro com linfadenopatia moderada não apresentaram material compatível com leitura. Das 23

amostras analisadas 16 eram do grupo negativo para infecção pelo FeLV, quatro do grupo com infecção progressiva e três com a forma regressiva.

Os resultados de mediana, média e desvio-padrão da contagem diferencial dos tipos celulares nos linfonodos de cada grupo se encontram na tabela 7.

Ocorreu redução na contagem de pequenos linfócitos em 37,5% (6/16) no grupo negativo, enquanto nos grupos positivos encontrou-se 50% e 66,6% (2/4 e 2/3) nos grupos progressores e regressores respectivamente. O aumento dos centrócitos foi observado em 37,5% (6/16), 25% (1/4) e 66,6% (2/3) nos grupos de animais negativos, progressores e regressores respectivamente. Células médias macronucleadas, que não são comumente visualizadas em linfonodos de felinos, foram observadas em 50% (8/16) dos animais não diagnosticados com FeLV, 50% (2/4) nos animais progressores e 66,6% (2/3) nos animais regressores.

Tabela 7: Valores de mediana, média e desvio padrão de contagem diferencial da citologia de linfonodo em gatos dos grupos negativo, progressor e regressor para FeLV.

	FeLV- (n = 16)		FeLV Regressor (n = 3)		FeLV Progressor (n = 4)		Estatística
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	
Pequenos linfócitos (VR maior ou igual a 80%)	81 (a)	81,7 ±8,2	75 (a)	79±8,7	78,5 (a)	78,8±7,5	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,7787)
Centrócitos (5- 10%)	9,5 (a)	9 ±4,6	11 (a)	11,7±6,0	8 (a)	7,8±3,8	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,5816)
Centroblastos (1- 5%)	2 (a)	2,7 ±1,6	1 (a)	1,3±0,6	2,5 (a)	3,5±2,4	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,1536)
Imunoblastos (1- 5%)	0,5 (a)	1,1 ±1,8	1 (a)	1±1	1,5 (a)	2±2,2	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,5838)
Media macronucleada (ausente)	0,5 (a)	1,1 ±1,2	1 (a)	1,3±1,5	0,5 (a)	1±1,4	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,9068)
Plasmócitos e Flame cell (VR menor ou igual a 2)	0 (a)	0,6 ±1,1	0 (a)	0,3±0,6	2 (b)	3±2	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,0187)
Células Mott (menor ou igual a 1)	0	0	0	0	0	0	-
Histiócitos	0	0	0	0	0	0	-
Macrófagos (VR menor ou igual a 2)	1 (a)	0,8±0,9	1 (a)	1,3±0,6	0,5 (a)	0,8±0,9	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,4739)
Neutrófilos (VR menor ou igual a 5)	1 (a)	1,4 ±1,8	0	0,7±1,2	1 (a)	1,3±0,5	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,6216)
Eosinófilos (VR menor ou igual a 3)	0 (a)	0,6 ±1,0	1 (a)	2±2,6	1 (a)	1,5±1,9	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,3517)
Mastócitos (VR menor ou igual a 3)	2 (a)	1,6 ±1,2	1 (a)	1±0	1 (a)	1,3±0,5	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,7363)
Linfoblastos	0 (a)	0,1 ±0,3	0 (a)	0	0	0	Kruskal-Wallis + Dunns (p = 0,8035)
Basófilos	0	0	0	0,3±0,6	0	0	-

A realização da imunofenotipagem de linfonodos foi determinada pela quantidade de eventos lidos, impossibilitado pela pouca concentração de células nas amostras. Sendo assim, foi realizada a leitura de linfonodos de quatro animais negativos, dois regressores e quatro progressores cujos resultados estão representados na tabela 9 e figura 2.

A concentração média de linfócitos nas amostras de linfonodo foi de 46,7%, 26,7% e 50,2% nos grupos negativos, regressores e progressores, respectivamente (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,0881$). Os animais infectados de forma progressiva apresentaram concentrações médias de linfócitos T auxiliares (CD4+) de 23,3%, superior ao observado nos grupos infectados de forma regressiva (22,1%) e negativos para a infecção (20,51) (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,9509$). Em contrapartida os regressores obtiveram resultados mais elevados para concentração média de células T citotóxicas (CD8+) (12,2%) quando comparado com os outros grupos, mas também não houve significância (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,4524$). Isso fez com que a relação CD4+/CD8+ nos linfonodos fosse menor nos animais regressores (3,095) e progressores (3,449) em relação aos negativos para FeLV (5,799), mas o valor de p não foi significativo ($p = 0,7575$).

O grupo de animais negativos apresentou média na concentração de linfócitos B de 70,0%, valor consideravelmente aumentado quando comparado ao grupo de animais regressores (1,16%) (ANOVA *ad-hoc* Tukey, $p = 0,0306$), mas sem diferença em relação aos progressores (28,6%).

Tabela 8: Valores de mediana, média e desvio padrão de imunofenotipagem em linfonodo de gatos de grupos negativo, regressor e progressor para infecção por FeLV.

	FeLV- (n = 4)		FeLV Regressor (n = 2)		FeLVProgressor (n = 4)		Estatística (ANOVA <i>ad-hoc</i> Tukey)
	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	Mediana	Média + D.P	
% “Gate” linfócitos	47,3	46,7±8,8	-	26,7±7,5	55,9	50,2±12,8	$p = 0,0881$
% Linfócitos t CD4	17,4	20,5±16,3	-	22,1±0,35	24,2	23,3±10	$p = 0,9509$
% linfócitos T CD8	3,7	3,7±5,4	-	12,2±11,2	6	6,2±3,6	$p = 0,4524$
% Linfócitos B	72,8	70,0±18,1	-	1,1±0,02	25,3	28,6±32,6	$p = 0,0306$

Valores de referência inexistentes.

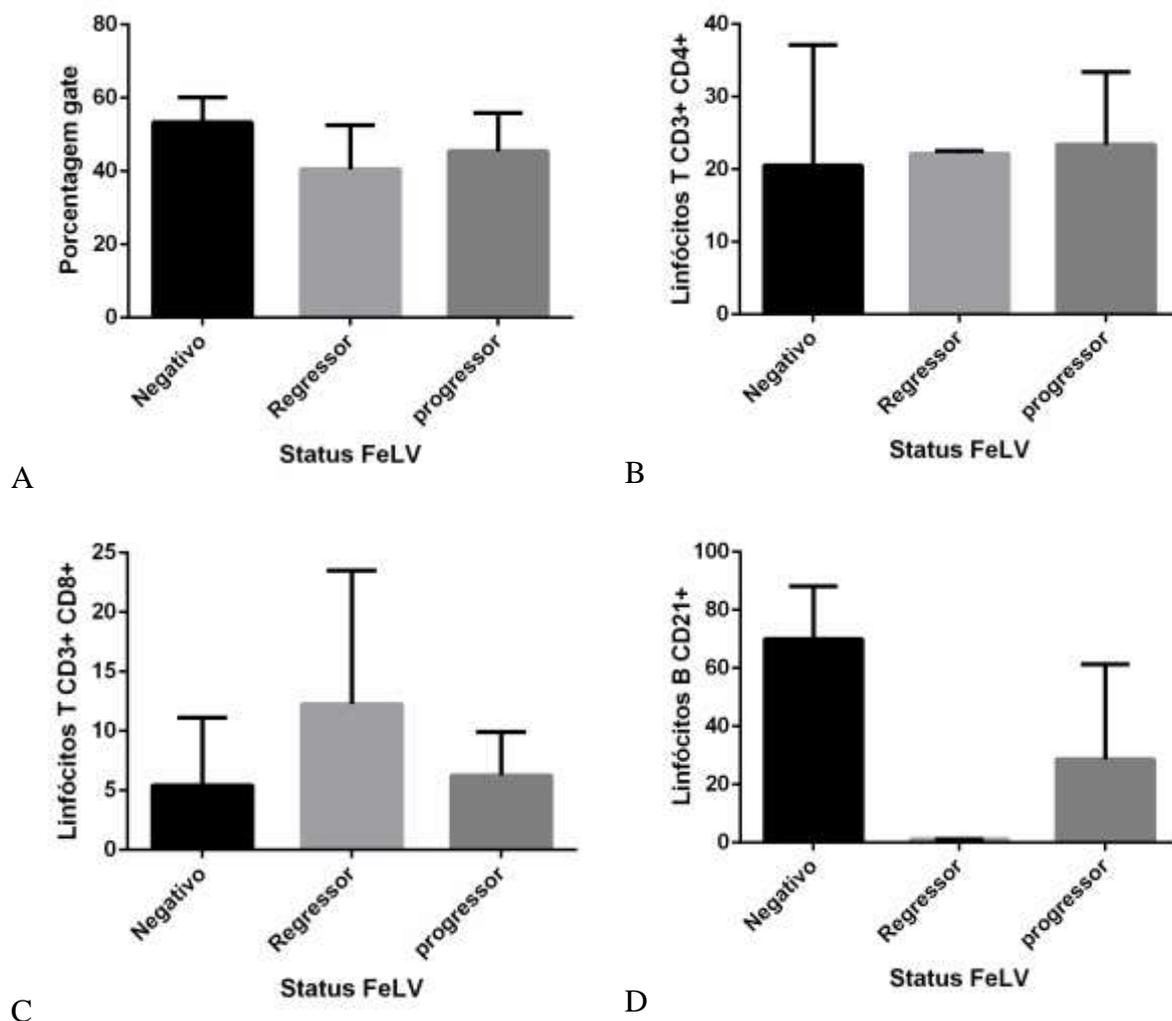


Figura 2: Imunofenotipagem de linfócitos em linfonodo representando média e desvio-padrão de gatos dos grupos negativo, regressores e progressores. (A) Média e desvio-padrão de cada grupo do total de linfócitos marcados no “gate”. (B) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD4. (C) Média e desvio-padrão de cada grupo dos linfócitos marcados para CD3 e CD8. (D) Média e desvio-padrão de cada grupodos linfócitos marcados para CD21.

6. DISCUSSÃO

O FeLV tem ampla distribuição mundial e prevalência variável dependendo da região, animais estudados e técnica diagnóstica utilizada, sendo as regiões com maior prevalência conhecida a América Latina, oeste da África e o sul da Europa (Buch et al, 2017). O presente estudo avaliou animais assintomáticos e presumidamente saudáveis como amostragem e foram realizadas técnicas que avaliam a infecção ativa, com viremia e infecção latente com a presença do DNA próviral.

Considerando positivos como todos os animais que apresentaram resultado positivo para DNA próviral e/ou para a presença de antígeno (no caso desse estudo todos os animais com viremia foram positivos para DNA próviral) a prevalência foi de 20,4% (10/49), mas quando consideramos apenas os animais virêmicos a prevalência foi de 12,2% (6/49).

A prevalência de FeLV nesse estudo, considerando apenas os animais progressores (avaliação antigênica), foi de 12,2%, superior às taxas encontradas no sul do Brasil, Malásia e Portugal (9,8%, 5,1% e 10%, respectivamente), com metodologia similar, considerando animais presumidamente saudáveis de abrigos, campanhas de castração e resgatados (Bande et al., 2012; Biezus, 2017; Rosado, 2019). Em um estudo epidemiológico sobre doenças infecciosas em Portugal foi verificado a antigenemia utilizando o mesmo teste do presente estudo em animais para castração eletiva e a prevalência encontrada foi inferior, de 7,1% (Duarte et al, 2010). Enquanto em Madrid, Espanha, um estudo avaliou 190 gatos saudáveis e encontrou 15,6% de antigenemia persistente (Arjona et al., 2000). Em Belo Horizonte, Brasil, a taxa de prevalência do FeLV de viremia em animais de abrigo foi de 32,5%, resultados superiores ao encontrado nesse estudo (Teixeira et al., 2007). Apesar dos resultados de animais assintomáticos progressores obtidos nesse estudo serem superiores aos encontrados recentemente em outros locais, quando comparados a estudo antigos observou-se uma redução da prevalência do vírus, o que pode ser consequência de campanhas de vacinação, aumento da testagem com segregação de animais positivos e maiores cuidados relacionados aos animais domiciliados, como foi observado por Gleich et al. (2009) na Alemanha com redução de 6% para 1% em um período de 10 anos.

A prevalência encontrada em testes de antígeno no Espírito Santo foi de 33,7% e 42,7% em animais levados para atendimento hospitalar, enquanto o DNA proviral do FeLV foi

amplificado em 47,5% das amostras avaliadas também de animais de atendimento clínico, associando infecções progressivas e regressivas, mas sem diferenciá-las (Coelho, et al, 2011; Almeida, et al., 2021; Gonçalves, et al., 2021). O PCR para DNA proviral detecta a forma progressiva, mas também regressiva da doença, exceto em situações de infecções recentes ou baixíssima carga proviral, o que pode gerar resultados falso-negativos. A pesquisa do DNA proviral revelou 12,1% (12/164) de positividade, no Mato Grosso (Silva, 2016), inferior ao encontrado no presente estudo, mesmo sendo amostras advindas de atendimentos em clínicas e, possivelmente sintomáticos.

A prevalência de animais infectados pelo FeLV é maior em animais que apresentam algum sintoma clínico, considerando que o vírus predispõe a doenças e alterações na imunidade do animal (Hartman e Hofmann-Lehmann, 2020). Levantamentos com animais assintomáticos nos Estados Unidos e Europa observam redução drástica na taxa de infecção quando comparados com animais não-hígidos (Levy et al., 2006; Gleich e Hartmann, 2009). Um estudo realizado no Rio de Janeiro observou que 32,5% dos animais progressores são assintomáticos, o que dificulta a comparação com estudos que avaliam animais sintomáticos ou em atendimento veterinário por procura do tutor, subestimando a real prevalência do vírus na população (Almeida et al, 2016).

Fatores de risco podem estar relacionados ao aparecimento de sintomas e doenças relacionados ao FeLV, dentre eles, idade da contaminação, sendo animais mais jovens mais susceptíveis, ausência de vacinação, falhas na imunidade, virulência e mutações na cepa contaminante (Hartmann e Hofmann-Lehmann, 2020).

A prevalência de pulgas nos animais (16,3%) foi inferior a outros estudos que obtiveram valores que variavam de 23,07% à 73,07%, sendo maior a prevalência desses ectoparasitas nos estudos que envolvem animais da zona rural (Moura, 2008; Ferreira, et al., 2010; Villegas, 2019), os animais desse estudo eram de zona urbana e a maioria era representada por animais recém resgatados que podem ter recebido ações farmacológicas para controle de ectoparasitas.

6.1 Perfil bioquímico

O valor encontrado de proteína total diferiu de estudos realizados anteriormente que não encontraram aumento significativo de proteínas totais quando compararam animais negativos e positivos para FeLV (Gleich e Hartmann, 2009; Arjona et al., 2020; Duda et

al., 2020; Gonçalves et al., 2021). Houve correlação positiva moderada entre animais infectados e aumento na proteína total ($r=0,34$) e globulina com correlação fraca ($r=0,29$), mas os resultados encontrados estavam dentro dos valores de referência. Pode ocorrer aumento de globulina e albumina associado com maiores cargas virais e aumento da produção de IgG e IgM (Wernicke et al., 1986; Duda et al., 2020). Em contraponto, a frequência de hiperalbuminemia e hiperglobulinemia é incomum em gatos positivos para o vírus (Miro et al., 2007; Gleich e Hartmann, 2009), mas pode ocorrer no início da infecção com aumento inespecífico na produção de imunoglobulinas e imunocomplexos e por desregulação da resposta imunológica pela perda de atividade das células T desencadeada pelo efeito do vírus (Pedersen, 1988; Hartmann, 2011).

Aumento da ALT ocorreu em 26,7% dos animais infectados progressivamente pelo FeLV em um estudo realizado no estado do Espírito Santo (Gonçalves et al., 2021), achado similar aos dados desse estudo, o que foi observado também por outros autores podendo ocorrer por lesão superficial de hepatócitos (Gleich e Hartmann, 2009). A média nos animais negativos foi de 83,2 U/L, mas isso pode ser explicado devido ao aumento expressivo de um dos animais que apresentou resultado de 948 U/L, resultando em elevado desvio padrão (147,34 U/L).

A concentração de creatinina foi significativamente menor no grupo dos animais negativos, esse resultado também foi encontrado por Gleich e Hartmann (2009) que determinaram que esse aumento no grupo saudável se deve a maior idade dos animais, o que não justifica esse achado no presente trabalho, sendo necessários mais estudos para corroborar que essa alteração possa estar relacionada à alguma fase da patogenia do vírus. Animais com glomerulonefrite infectados pelo FeLV apresentam altas cargas antigênicas circulantes que podem aumentar complexos antígeno-anticorpo e as próprias proteínas virais causando a lesão renal (Day et al., 1980; Tuomari et al., 1984; Tizard, 2014), podendo explicar maior valor de ureia encontrado nos animais com infecção progressiva no presente estudo. Ao mesmo tempo, resultados não significativos para aumento de uréia e creatinina em animais infectados foram encontrados (Arjona et al., 2000; Gonçalves, 2021).

6.2 Hemograma

A anemia é a principal alteração no hemograma de animais infectados pelo FeLV devido à replicação do vírus nas células precursoras eritróides na medula óssea, dentre outros mecanismos imunomediados, inflamatórios e hemolíticos envolvidos (Hartmann, 2011; Hartmann, 2015; Nesina et al., 2015).

Os valores de média de volume globular foram similares aos de um estudo realizado no Rio de Janeiro que avaliou animais positivos com antigenemia assintomáticos e apresentaram média de 33,1% nesse parâmetro, e animais sintomáticos no mesmo estudo para esse mesmo parâmetro observou-se média de 22,65% (Almeida, 2016). Em outros estudos 50% e 65,5% dos animais sintomáticos, com antigenemia persistente, apresentaram anemia, sendo que as médias nos valores de volume globular se apresentaram significativamente menores em animais sintomáticos em relação aos assintomáticos (Almeida, 2017; Biesuz, 2017). Esses dados corroboram a diferença nos valores do eritrograma entre animais positivos assintomáticos e sintomáticos, sendo o segundo grupo muito mais passível de alterações que o primeiro.

Animais positivos para FeLV (regressores e progressores) apresentam resultados significativamente maiores para VCM (Hartmann e Hoffmann-Lehmann, 2020), resultado também encontrado por Bieuz (2017) tanto em animais sintomáticos quanto assintomáticos, no presente estudo o CHCM foi inferior para os animais infectados. Essas alterações podem ser explicadas por uma deseritropiese, com alterações na maturação dessas células em animais positivos por alterações causadas pelo próvirus nas células eritropoiéticas da medula óssea, mas isso não foi observado nas medulas ósseas estudadas. Estudos observaram aumento no volume corpuscular médio em felinos infectados pelo vírus da FeLV sem a presença de anemia quando comparados a animais negativos para a infecção e sugeriram que poderia estar relacionado a uma fase anterior a hipo-proliferação eritróide causada pelo vírus na medula óssea (WeisereKociba, 1983).

O grupo de animais com infecção assintomática progressiva apresentou valor de média de leucócitos similar ao encontrado por Almeida (2016) que comparou animais sintomáticos e assintomáticos, com média de 10,5% e 13,5% respectivamente. A maior média de leucócitos nos animais regressores, no presente estudo pode ter sido o resultado da presença de discreta leucocitose em dois animais do grupo, alterando a média, diante

de um espaço amostral reduzido nesse grupo. Entretanto, em gatos progressores, sintomáticos, pode ocorrer uma diminuição na concentração de neutrófilos circulantes, com leucopenia em até 32,5% dos casos (Almeida, 2016). A leucopenia é um achado comum em animais infectados com FeLV, principalmente por neutropenia e linfopenia, por supressão da medula óssea, e tem como consequência imunossupressão que é uma das responsáveis pela alta frequência de infecções secundárias nesses animais (Hardy e Essex, 1986; Arjona et al., 2000; Lutz, 2009; Hartmann, 2012; Almeida, 2016).

Um estudo realizado em Porto Alegre por Duda et al. (2020) apresentou resultados discordantes, obtendo maior média de leucócitos em animais progressores sintomáticos, seguido pelos regressores e progressores assintomáticos, dado corroborado ainda por um estudo realizado em Santa Catarina com metodologia semelhante (Biesuz, 2017) precisando de mais estudos para tentar avaliar a resposta dos leucócitos diante dos diferentes tipos de infecção causadas pelo FeLV.

Linfopenia é um achado comum em animais infectados pelo FeLV, principalmente devido à redução de Linfócitos T CD4⁺ (Hofmann-Fezer et al., 1996; Hartmann, 2011), mas com diferenças significativas na frequência e concentração entre animais assintomáticos e sintomáticos, sendo os últimos apresentando resultados inferiores e em maior frequência (Almeida, 2016). No presente estudo, os animais positivos não apresentaram essa alteração provavelmente por serem todos assintomáticos e também não houve diferenças entre os grupos como encontrado em outro estudo (Biesuz, 2017).

A concentração de monócitos, apesar de não apresentar diferença estatística, foi maior nos animais progressores, corroborando dados encontrados em outros estudos (Biesuz, 2017; Duda et al., 2020). A presença de monócitos ativados em animais com infecção regressiva pode ser explicada pela sua atuação imunorreguladora apresentando antígenos processados aos linfócitos T, agindo também em situações inflamatórias e imunomediadas (Thrall, 2007; Stockham e Scott, 2008).

Eosinofilia e basofilia, apesar de terem sido comuns, não foram mais frequentes nos grupos positivos e não houve relação com animais infestados por pulgas. Podem ser explicados pela ausência de vermifugação e a origem dos animais participantes recém resgatados que foram mais expostos a parasitas ou podem ser um achado acidental,

principalmente no caso dos basófilos, por não terem sido observados aumentos moderados em sua concentração (Stockham e Scott, 2008).

A trombocitopenia é uma das principais alterações associadas ao FeLV, após anemia e leucopenia, sendo mais comum em animais infectados progressivamente (GleicheHartmann, 2009, Muchaamba et al., 2014; Almeida, 2016), mas essa contagem pode ser subestimada quando associada a presença de agregados plaquetários.

Apesar das suspeitas de que o FeLV em sua forma regressiva poderia causar alterações hematológicas, principalmente citopenias, alguns estudos não observaram diferenças entre animais com a forma latente (regressiva) do vírus e grupos controle, concluindo que essas alterações podem não ser encontradas (Herring, et al., 2001; Stutzer et al., 2010). As citopenias no grupo dos animais progressores foram raras, o que vai de encontro com a bibliografia (Gleich e Hartmann, 2009; Stutzer 2011), mas pode ser explicado pela ausência de sintomatologia clínica nesses animais que podem apresentar viremia ativa e ausência de alterações meses ou anos após a infecção.

6.3 Medula Óssea

Apenas três animais apresentaram medula hipercelular e todos estavam no grupo negativo para a infecção. Poucos estudos avaliaram a medula óssea de animais infectados avaliando as diferentes formas da doença e com animais assintomáticos. Duda et al. (2020) avaliaram animais regressores e progressores assintomáticos e encontraram celularidade superior para esses grupos do que no presente estudo. O mesmo estudo relacionou VCM aumentado na ausência de reticulocitose em animais infectados, o que não ocorreu no nosso trabalho, pois na comparação de grupos os animais positivos apresentaram maior VCM comparado ao grupo negativo, mas nenhum deles fora dos valores de referência.

Apesar das médias dos grupos na relação mieloide:eritróide estarem dentro dos valores utilizados como referência para a espécie (Jain, 1993), uma relação M:E diminuída foi encontrada com frequência, inclusive nos animais do grupo negativo. Outros trabalhos atuais em animais saudáveis encontraram um valor de referência na relação M:E menor do que essa literatura, isso pode ser explicado pelo pequeno número de amostras avaliadas nos trabalhos dos quais esses valores foram estabelecidos e evidencia a necessidade de

novos estudos que avaliam animais saudáveis em diferentes modos de vida e regiões (Nunes, 2019; Duda et al., 2020).

Um estudo com animais anêmicos positivos no teste de antígeno comprovou que as principais alterações causadas pelo vírus nos animais infectados são citopenias (volume globular e neutrófilos e seus prevursores na medula óssea), trombocitopenia e uma maior probabilidade de desenvolvimento de distúrbios mieloproliferativos e deseritropoieses (Almeida, 2017). As citopenias geralmente são causadas por infecção progressiva do FeLV, mas um estudo encontrou 5,4% dos animais infectados de forma regressiva com citopenias arregenerativas (Stutzer et al., 2010).

O aumento médio na concentração de blastos (rubriblastos e mieloblastos) na medula óssea nos grupos avaliados vai de encontro ao valor de referência determinado anteriormente (Jain, 1993; Nunes, 2019), mas valores superiores dessas células foram relatados previamente (Gilmore et al., 1964), sendo necessário maiores estudos para essa determinação, considerando as diferenças locais e de meio de vida dos animais. A idade dos animais desse estudo não pôde ser avaliada de forma exata, mas supõe-se que sejam animais jovens com menos de 24 meses de vida, justificando, ao menos que parcialmente, o aumento na contagem de blastos na medula. No presente estudo houve correlação moderada no aumento de rubriblastos e mieloblastos associados.

Aumento de pró-mielócitos e pró-rubricitos em animais com infecção progressiva ocorreu associado com o aumento de blastos dessas duas linhagens, assim como o aumento de rubricitos nos mesmos animais. Ocorreu uma tendência de aumento das células imaturas eritróides nos animais progressores, assim como em um estudo realizado por Duda et al. (2020), o que não ocorreu com as células mielóides, alterando a relação M:E desse grupo, mas esses resultados não foram além do valor de referência para esse parâmetro. Mais estudos são necessários para avaliar a tendência desse aumento e seu papel na manutenção dos componentes eritróides na medula óssea e sangue periférico de gatos saudáveis e infectados pelo FeLV.

Apesar desse estudo não ter demonstrado hiperplasia eritróide nos animais com infecção progressiva, outro estudo com animais com infecção progressiva e anêmicos 80% dos animais apresentaram essa alteração (Nunes, 2019).

Gatos apresentam cordões linfóides na medula óssea, sendo comum observar até mais que 20% de pequenos linfócitos maduros na contagem diferencial, sendo maiores os valores em animais jovens do que em adultos (Raskin e Messick, 2012). Animais com infecção regressiva apresentaram valor de média próximo ao limite superior do valor de referência. Duda et al. (2020) observaram maiores valores de concentração de linfócitos na medula óssea de animais regressores e do grupo controle quando comparados aos progressores, mas não houve diferença estatística na média encontrada, assim como nesse estudo.

6.4 Avaliação dos linfonodos

O aumento de plasmócitos em animais progressores comparados aos outros grupos, pode ser explicado pela reatividade que pode ocorrer no tecido linfóide pela presença do antígeno e estímulo a produção de anticorpos, que pode antecipar uma linfadenomegalia palpável (Cowell et al., 2003; Comazzi e Mcneill, 2017)

Doze animais apresentaram presença da célula média macronucleolada (máximo 3%) que faz parte da zona marginal, mas que geralmente não é visualizada em gatos, a média de todos os grupos foi próximo de um podendo sinalizar que a observação dessas células pode ocorrer ocasionalmente.

6.5 Imunofenotipagem de sangue e linfonodos

Poucos trabalhos avaliam e padronizam a diferenciação da imunofenotipagem em gatos domésticos saudáveis, sendo necessários maiores estudos para o estabelecimento de valores de referência para a espécie. Em relação aos animais negativos para a infecção pelo FeLV, os resultados apresentaram valores similares no “*gate*” padrão de linfócitos, aos de um estudo que estabeleceu esses valores em 32 gatos saudáveis sendo 24,9% (CD4+), 12,3% (CD8+) e 25,3% (CD21) (Castro, 2017) e também ao estudo de Byrne et al. (2000) que observou 75% de linfócitos T e 25% de linfócitos B. Essas concentrações dependem ainda dos reagentes e metodologias utilizadas, além da população incluída na pesquisa (Workmann e Vernau, 2003). Em gatos, fatores como idade, raça e gênero podem interferir nesses resultados (Byrne et al., 2000)

A imunodeficiência relacionada ao FeLV afeta linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B no sangue, linfonodos e medula óssea (Quakenbush et al., 1996). Animais que após a exposição ao vírus apresentam aumento de linfócitos T citotóxicos apresentaram

recuperação e não progrediram para a doença, enquanto animais que continuaram com viremia persistente além da demora da imunidade humoral, ocorreu também redução da imunidade celular (Flynn et al, 2002). No presente estudo, apesar da menor relação CD4+/CD8+ no sangue periférico dos animais progressores em relação aos regressores, indicando menor concentração de linfócitos T auxiliares, não houve significância estatística, possivelmente pelo reduzido n amostral nos grupos positivos para FeLV. Em fases iniciais da infecção os gatos podem apresentar valores menores de linfócitos T CD8+, mas esses valores tendem a voltar ao normal, reduzindo assim essa relação devido à diminuição na concentração de linfócitos auxiliares (Tizard, 2014). O aumento da relação de linfócitos T auxiliares com linfócitos T citotóxicos também ocorre em animais vacinados (Flynn et al., 2000).

Ocorre redução de linfócitos T CD4+ pela replicação viral nessas células, com consequente linfopenia nos animais com infecção progressiva (Donahue et al., 1991; Hartmann, 2012), e embora a porcentagem obtida nos gatos progressores tenha sido menor, não foi observada diferença na análise estatística.

Os animais com infecção progressiva apresentaram menores médias para linfócitos B tanto em sangue quanto em linfonodo, podendo ser devido a imunossupressão causada pelo vírus, essa menor concentração pode justificar a resposta humoral tardia e reduzida de animais com viremiapersistente (Wernicke et al., 1986). A concentração de linfócitos B pode reduzir em um contato inicial, mas de forma menos intensa que linfócitos T, podendo ocorrer baixa produção de IgM em gatos com baixas doses de antígeno (Tizard, 2014)

Houve um aumento significativo de monócitos nos animais infectados progressivamente comparados com os animais sem viremia ativa, apesar de não existirem estudos que fizessem a identificação desse tipo celular através da imunofenotipagem em gatos infectados, podemos inferir que a maior concentração dessa célula se deve a presença do antígeno e à necessidade de apresentação deles ao sistema imune através dos monócitos, fagocitose e produção de interleucinas nas infecções e inflamações (Stockham e Scott, 2008; Tizard, 2014).

A média de linfócitos em linfonodo marcados no gráfico fornecido pelo citômetro foi mais baixa nos animais regressores do que nos demais grupos, entretanto, apenas duas

amostras foram analisadas e ambas apresentaram valores inferiores a todos os outros gatos do estudo. Na citologia não é possível diferenciar os pequenos linfócitos em B ou T, entretanto centrócitos, centroblastos e células médias macronucleoladas pertencem ao grupo de linfócitos B, somando-se as médias alcançadas por estas células por cada grupo, o grupo dos animais regressores apresentaram maior soma desses três tipos celulares, podemos inferir que esse maior valor pode ser devido à produção de anticorpos que podem estar sendo ou que foram produzidos para conter a viremia.

7. CONCLUSÕES

Nas condições desse estudo foi observada elevada prevalência de FeLV em gatos resgatados, assintomáticos, com predominância da forma progressiva da doença.

Os valores de CHCM são, em geral, inferiores em gatos infectados (forma regressiva ou progressiva), em relação a gatos negativos para FeLV, enquanto os valores de VCM são superiores.

Não houve diferença na concentração de linfócitos na medula óssea dos gatos de acordo com o status da infecção. Entretanto, observou-se redução da relação mielóide:eritróide e aumento da contagem de blastos, havendo correlação moderada entre o aumento de rubriblastos e mieloblastos, em relação à literatura vigente, mesmo em gatos hígdos, negativos para FeLV.

Pela citometria de fluxo observa-se maior concentração de monócitos no sangue nos gatos com antigenemia persistente para o FeLV em comparação àqueles com a forma regressiva da doença ou negativos. Não houve diferença na relação de linfócitos CD4⁺/CD8⁺ conforme o status FeLV.

Nas demais análises não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados, sendo necessários mais estudos com um número amostral maior para determinar alterações causadas pelas diferentes formas de infecção pelo FeLV, principalmente no estudo da imunofenotipagem, linfonodo e medula óssea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N.R. Ocorrência da infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro e Baixada Fluminense e análise dos fatores de risco para a infecção. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense. p. 32, 2009.

Almeida, N.R.; Soares, L.C.; Wardini, A.B. Alterações clínicas e hematológicas em gatos domésticos naturalmente infectados pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV). *Revista de Saúde*. v. 07, n.1, p. 27-32, 2016.

ALMEIDA, T.M. Alterações citológicas da medula óssea e sangue periférico de gatos anêmicos naturalmente infectados pelo vírus da leucemia felina. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará. p. 94, 2017.

ALMEIDA, I.O.; SILVA, M.A.A.; SENA, B.V.; PAZ, J.S.; JARETTA, T.A.; FARIA, P.C.G.; HORTA, R.S. Retrospective study of retroviruses by immunoenzymatic test in cats in Grande Vitória (ES, Brazil) and associated neoplasms. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 43, e1024220, 2021.

ANAI, Y.; OCHI, H.; WATANABE, S. et al. Infections endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of Virology*, v. 86, n. 16, p. 8634-8644, 2012.

ARBER D., ORAZI A., HASSERJIAN R., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. v.127, n.20 p.2391-2405, 2016.

ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; et al. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n.9, p. 3448-3449, 2000.

AUGUST, J.R. Moléstias virais felinas. In: ETTINGER, S. J. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole, cap.48. p. 340-346, 1992.

AQUINO L. C. Ocorrência do vírus da leucemia felina no Distrito Federal e suas alterações 7 laboratoriais. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Brasília-DF/UNB. 1- 83. 2012.

- AZEVEDO V.L.M. Lesões de reabsorção odontoclástica felina e a sua associação a gatos positivos ao 15 vírus da Leucemia (FeLV) e da Imunodeficiência (FIV) felinas. Dissertação de Mestrado em 16 Medicina Veterinária, Lisboa- Portugal. 1- 143. 2008.
- BAAR M.C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Anim)*, v. 11,p.1-143, 1996.
- BAAR, F. Feline Leukemia virus. *Journal of Small Animal Practice*,v. 39, n. 1, p. 41-43, 1998.
- BANDE, F.; ARSHAD, S.S.; HASSAN, L. et al. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia vírus from naturally infected cats in Malaysia. *Veterinary Medicine International*, v. 2014, 2014.
- BEALL, M.J.; BUCH, J.; CLARCK, G. et al. Feline Leukemia Virus p27 Antigen Concentration and Proviral DNA Load Are Associated with Survival in Naturally Infected Cats. *Viruses*, v. 13, p. 302, 2021.
- BIEZUS, G.; MACHADO, G.; FERIAN. P.E. et al. Prevalence of and factors associated with feline leucemiavírus (FeLV) and feline immunodeficiency (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 63, p.17-21, 2019.
- BYRNE KM, KIM HW, CHEW BP, REINHART GA, HAYEK MG. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 73, n.2, p. 167–182, 2000.
- BLUE, J.T. Myelofibrosis in cats with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leucemia. *Veterinary Pathology*. v. 25, p. 154-160, 1988a.
- BOLIN, L.L.; LEVY, L.S. Viral determinants of FeLV infection and pathogenesis: Lessons learned from analysis of a natural cohort. *Viruses*. v.3, p. 1681-1698, 2011.
- BROWN, M.R.; ROGERS, K.S. Neutropenia in dogs and cats: A retrospective study of 261 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.37, p.131-139, 2001.
- BUCH J, BEALL M, O’CONNOR T, ET AL. Worldwide clinic-based serologic survey of FIV antibody and FeLV antigen in cats. *ACVIM Forum, National Harbor, Md*, 8–10 June 2017.

- CARMICHAEL, K.; BIENZLE, D.; MCDONNELL, J. Feline leukemia virus associated myelopathy in cats. *VeterinaryPathology*, v. 39, p.536, 2002.
- CASTRO, D. Achados imunofenotípicos de leucócitos em gato. Trabalho de conclusão de curso da Universidade federal da Paraíba. p. 27, 2017
- CATTORI V.; PEPIN A.C.; TANDON R., et al. Real-time PCR investigation of feline leukemia virus pro viral and viral RNA loads in leukocyte subsets. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 123, p.123-128, 2008.
- CATTORI V.; TANDON R.; RIOND B., et al. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. *Veterinary Microbiology*, v. 133, p. 292-296, 2009.
- CHIU, E.S.; HOOVER, E.A.; VANDEWOUDE, S. A retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: Viral interference assays to deep sequencing. *Viruses*, v. 10, n. 1, 2018.
- CHENG, H.H.; ANDERSON, M.M.; OVERBAUGH, J. Feline leukemia virus T entry is dependent on both expression levels and specific interactions between cofactor and receptor. *Virology*, v. 359, p. 170-178, 2007.
- COELHO, F.M.; MAIA, M.Q.; LUPPI, M.M. et al. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 3, p. 778-783, 2011.
- COMAZZI, S.; MACNEILL, A. L. Cytology of Lymphoid Tissues. In: BARGER, A. M.; MACNEILL, A. L. *Small Animal Cytologic Diagnosis*. Editora CRC Press, p. 209 – 240, 2017.
- COSTA, F,V,A; VALE, S.F.; MACHADO G. et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from Southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 12, 2017.
- COTTER, S.M.; HOLZWORTH. Disorders of the hematopoietic system. IN: HOLZWORTH, J. *Diseases of the cat: Medicine & Surgery*. Philadelphia: W.B Saunders Company, v.1, cap. 16, p.739-807, 1987.
- COTTER, S.M. Feline viral neoplasia. In: Greene C E. *Infectious diseases of dog and cat*, ed 2. W.B. Saunders, Philadelphia. 1998.

- COUTO, C.G. Diagnóstico e tratamento de doenças retrovirais em gatos. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.702-705, 1994.
- CRAWFORD, C. Progressos no diagnóstico de infecções retrovirais. In: AUGUST, J.R. Medicina Interna de Felinos. USA: Elsevier, cap.6, p.53-62, 2011.
- CRISTO, T.G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L.F.; PEREIRA, L.H.H.; WIHOEFTI, J.A.; FURLAN, L.V.; COSTA, L.S.; TRAVERSO, S.D.; CASAGRANDE, R.A. Felinelymphoma and a high correlation with feline leukemia virus infection. *Brazil Journal of Comparative Pathology*, v. 166, p. 20-28, 2020.
- DAY, N.K.; O'REILLY-FELICE, C.; HARDY, W.D. JR.; GOOD, R.A.; Witkin, S.S. Circulating immune complexes associated with naturally occurring lymphosarcoma in pet cats. *Journal of Immunology*, v. 125, p. 2363-2366, 1980.
- DOBSON J.; VILLIERS E.; MORRIS J. Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats. *In Practice*. v.28, n.1, p.22-31, 2006.
- DONAHUE, P.R. et al. Viral genetic determinants of T-cell killing and immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. *Journal of Virology*, v.65, p.4461-4469, 1991.
- DUARTE, A.; CASTR, I.; FONSECA, I.M.P; et al. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan área, Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 12, p. 441-446, 2010.
- DUDA, N.C.B; ORTÍZ, L.C.; VALLE, S.L. et al. Laboratory and clinical findings and their association with viral and proviral loads in cats naturally infected with feline leukemia virus. *Comparative Immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 71, 2020.
- Essex, M. Feline leukemia: a naturally occurring cancer of infectious origin. *Epidemiologic Reviews*, v.4, p.189-203, 1982.
- FERREIRA, D.R.A.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Ectoparasitosis de *Felis catus* (Linnaeus, 1758) na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Biotemas*, v. 23, n.4, p. 43-50, 2010.
- FERREIRA, R.F; DITTRICH, R.L.; MONTANO, P.Y. et al. Perfis hematológicos, bioquímicos e proteína total de gatos infectados com o vírus da leucemia feline. *Archives of Veterinary Science*, v. 22, n. 4, p.111-115, 2017.

- FIGUEIREDO, A.S.; ARAÚJO Jr., J.P. Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral. *Ciência Rural*, v. 41, n. 11, p. 1952-1959, 2011.
- FLYNN, N.J.; HANLON, L.; JARRET O. Feline leukemia vírus: protective immunity is mediated by vírus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*. v. 101, p. 120-125. 2000.
- FLYNN, N.J.; DUNHAM, S.P.; WATSON, V. et al. Longitudinal analysis of feline vírus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 33, p. 1379-1399, 2002.
- FRANKS PT, HARVEY JW, MAYS MC, et al. Feline large granular lymphoma. *Veterinary Pathology*. v.23, p.200-202, 1986.
- GABOR L.J., JACKSON ML, TRASK B et al. Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. *Australian Veterinary Journal*, v. 79, p.476-481, 2001.
- GILMORE, C.E.; GILMORE, V.H; JONES, T.C. Bone marrow and peripheral blood of cats: technique and normal values. *Veterinary Pathology*, v. 1, p. 18-40, 1964.
- GLEICH, R.; HARTMANN, K. Hematology and Serum Biochemistry of Feline Immunodeficiency Virus-Infected and Feline Leukemia Virus-Infected Cats. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 23, p.552-558, 2009.
- GONÇALVEZ, H.J.; FERRAZ, C.M.; HIURA, E. et al. Prevalência de Leucemia Viral Felina (FeLV) e principais alterações hematológicas em felinos domésticos em Vila Vleha, Espírito Santo. *Research, Society and Development*, v.10, n.6, 2021.
- GRINDEM, C.B.; HADDAD, J.L.; TYLER, R.D. et al. The Bone Marrow. In: COWELL, R.L.; VALENCIANO, A.C. Cowell and Tyler's diagnostic cytologic and hematology of the dog and cat. Fourth edition. Missouri: Elsevier. cap.27, p.489-526, 2014.
- GROSENBAUGH D.A.; LEARD T.; PARDO M.C., et al. Comparison of the safety and efficacy of a recombinant feline leukemia virus (FeLV) vaccine delivered transdermally and an inactivated FeLV vaccine delivered subcutaneously. *Veterinary Therapeutics*, v. 5, p.258-262, 2004.

- HAGIWARA, M.K.; RECHE JUNIOR, A.; LUCAS, S.R.R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.4, p.35-38, 1997.
- HARDY, W.D. Jr. Oncogenic Virus of Cat: the leukemia and sarcoma virus. In: HOLZWORTH, J. Disease of the Cat : medicine and surgery. Philadelphia. WB Saunders Company, p. 246-268, 1987.
- HARDY, W. D., JR., AND M. ESSEX. FeLV-induced feline acquired immune deficiency syndrome (FAIDS). A model for human AIDS. *Prog. Allergy* 37:353–37, 1986
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 143, n. 3, p. 190-201, 2011.
- HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: Greene, C.E. Infectious disease of the dog and cat. 3.ed. Georgia: Elsevier. cap.11, p.108-136. 2012.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*, v.4. p.2684-2710, 2012a.
- Hartmann, K). Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina. In: GREENE, C.E. Doenças Infeciosas em cães e felinos domésticos. Guanabara Koogan. v. 333 n.11, p. 113-143, 2015.
- HARTMANN, K.; HOFFMANN-LEHMANN, R. What´s new in feline leukemia vírus infection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 50, p. 1013-1026, 2020.
- HARVEY JW. Canine bone marrow: normal hematopoiesis, biopsy techniques, and cell identification and evaluation. *Compendium on Continuing Education Practice Veterinary*, v. 6, p.909-926, 1984.
- HARVEY, J.W. *Veterinary Hematology – A diagnostic guide and color atlas*. Missouri: Elsevier, 2012.
- HERRING ES, TROY GC, TOTH TE, ET AL. Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 3, p. 133–141, 2001.

- HISASUE, M.; OKAYAMA, H.; OKAYAMA, T. et al. Hematological abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 15, p. 471-477, 2001.
- HOFFMANN-FEZER, G.; MORTELBAUER, W.; HARTMANN, K.; et al. Comparison of t-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukemia virus or feline immunodeficiency virus. *Research on Veterinary Science*, n. 61, p.222-226, 1996.
- HOFFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J.B.; GRUBER, S. et al. Feline Leukemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal General Virology*, v. 82, p. 1589-1596, 2001.
- HOFFMANN-LEHMANN R, CATTORI V, TANDON R, et al. Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine* v. 25, p. 5531-5539, 2007.
- HOFFMANN-LEHMANN, R.; CATTORI, V.; TANDON, R. et al. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and immunopathology*. v. 123, p.119-123, 2008.
- HOOVER, E.A.; MULLINS, J.I. Feline leukemia-virus infection and diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* v. 199, p.1287-1297, 1991.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; TANDON, R; BORETTI, F.S. et al. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*. v.24, p. 1087-94, 2006.
- HORTA, R. S.; FAJARDO, A. L. ; COSTA, M. P. ; FORSSARD, L. S. ; NIMRICHTER, J. C. ; CARLI, M. D. ; PAES, P. R. O. . LOPH and D-MHC in the Treatment of FeLV Associated Acute Leukemia in a Cat. *Acta Scientiae Veterinariae (Online)*, v. 49, p. Pub. 628, 2021.
- ITO, J.; WATANABE, S.; HIRATSUKA, T.; ET AL. Refrex-1, a soluble restriction factor against feline endogenous and exogenous retroviruses. *Journal of Virology*, v. 87, n. 22, p. 12029-12040, 2013.
- JACKSON M.L.; HAINES, D.M.; MERIC, S.M., et al. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Canine Journal of Veterinary Research*, v.57, p.269-276, 1993.

- JAIN, N.C. Essential of Veterinary hematology. Philadelphia: Lea and Febiger, p 417, 1993.
- JAIN N. Classification of myeloproliferative disorders in cats using criteria proposed by the animal leukemia study group: A retrospective study of 181 cases (1969–1992). *Comp Haematol Int*, n.3, p.125-134, 1993.
- JARRETT, O.; GOLDER, M.C.;TOTH, S., et al. Interaction between feline leukaemia virus subgroups in the pathogenesis of erythroid hypoplasia. *International Journal of Cancer*, v.34 p.283-288, 1984.
- JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 99-107, 1999.
- KAWASAKI J, NISHIGAKI K. Tracking the continuous evolutionary processes of an endogenous retrovirus of the domestic cat: ERV-DC. *Viruses* v 10, p.179, 2018.
- KOCIBA, G.J.; LANGE, R.D.; DUNN, C.D.R. et al. Serum erythropoietin changes in cats with feline leukemia virus – induced erythroid aplasia. *Veterinary Pathology*, v. 20, p. 548-552, 1983.
- KOCIBA, G. Hematologic consequences of feline leukaemia virus infection. In: KIRK R. Current Veterinary Therapy. USA: WB Saunders. 448p. 1986.
- LAPPIN, M.R. FelineLeukemiaVirus. In: Seminário Internacional de Doenças Infecciosas, São Paulo. Anais...p. 36-44, 1998.
- LEVY, J.K. Felv and non-neoplastic felv-related disease. In Textbook of veterinary internal medicine, Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. Eds. WB Saunders: Philadelphia, 2000.
- LEVY JK, CRAWFORD PC AND SLATER MR. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 25, p. 1558-1561, 2004.
- LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L. et al. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in north america and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, v.228, p.371– 376, 2006.
- LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K. et al. American association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine Surgery*, v. 10, p. 300-316, 2008.

- LITTLE, S.; LEVY, J.; HARTMANN, K. et al. Feline retrovirus testing and management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v.22, p. 5-30, 2020.
- LORAND-METZE I. Síndrome mielodisplásica, sua importância no nosso meio. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, v.28, n.3, p.165, 2006.
- LUTZ, H.; ADDIE, B.; BELÀK, S. et al. Feline leukemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal Feline Medicine and Surgery*, v.11:565, 2009.
- MAGGIO, L.; HOFFMAN, R.; COTTER, S.M. et al. Feline pre-leukemia: an animal model of human disease. *Yale Journal of Biology Medicine*. v. 51, p.469-476, 1978.
- MAJOR, A.; CATTORI, V.; BOENZLI, E. et al. Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary Research*, v.41, p.17, 2010.
- MATTOS JR, SILVA DM, MACEDO LC. Síndrome Mielodisplásica: Da Suspeita ao Diagnóstico definitivo. *Rev. Saúde e Biol. SaBios*, v.11, n. 1, p.80- 89, 2016.
- MEHL, M.L. Feline leukemia virus. In: LAPPIN, M.R. *Feline International Medicine Secrets*, Philadelphia: Hanley & Belfus. Cap. 76, p. 387-391, 2001.
- K. MEICHNER, B.D. KRUSE, J. HIRSCHBERGER, K. HARTMANN. Changes in prevalence of progressive feline leukemia virus infection in cats with lymphoma in Germany, *Veterinary Records*, v.171, n.14, p.348-353, 2012.
- MIKAYE, A.; WATANABE, S.; HIRATSUKE, T. et al. Novel feline leukemia virus interference group based on the *env* gene. *American Society for microbiology*, v. 90, n.9, p. 4832-4837, 2016.
- MIRO, G.; DOMENECH, A.; ESCOLAR, E.; COLLADO, V.M.; TEJERIZO, G.; DE LAS HERAS, A.; GOMEZLUCIA, E. Plasma electrophoretogram in feline immunodeficiency virus (fiv) and/or feline leukemia virus (felv) infections. *Journal Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 54, p.203-209, 2007.
- MIYAZAWA, T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, n.1-3, p. 504, 2002.
- MODIANO, J.F. Hematologic Neoplasia. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. SCHALM'S Veterinary Hematology. Sixth edition. Wiley-Blackwell. Section V. p.420-557. 2010.

- MOSER, M.; BURNS, C.C.; BOOMER, S. et al. The host range and interference properties of two closely related feline leukemia variants suggest that they use distinct receptors. *Virology*, v. 242, p. 366-377, 1998.
- MOSTL, K.; EGBERINK, H.; ADDIE, D., et al. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. *Journal of Feline Medicine Surgery*. V.15, p.546-554, 2013.
- MOURA, V.E. Levantamento das espécies de pulgas de cães e gatos capturados no município de São Caetano do Sul, SP. Monografia apresentada no Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. p. 39. 2008.
- MUCHAAMBA, F. et al. A survey of feline leukaemia virus infection of domestic cats from selected areas in Harare, Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 85, n. 1, p 1-6, nov. 2014
- NESINA S, HELFER-HUNGERBUEHLER A, RIOND B, BORETTI FS, WILLI B, MELI ML, GREST P, HOFMANN-LEHMANN R. Retroviral DNA-the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology*. v. 12, p.105, 2015.
- NISHIGAKI K.; OKUDA, M.; ENDO, Y. et al. Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. *Journal of Virology*. v. 71, p. 9823–9827, 1997.
- NUNES, N.J.S. Avaliação citológica e de estoque de ferro na medula óssea de gatos jovens clinicamente saudáveis: determinação de valores de referência. Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 44, 2019.
- O'CONNOR, T.P. Jr; TONELLI, Q.J.; SCARLETT, J.M. et al. Report of the national FeLV/FIV awareness project. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 199, p.1348-1353, 1991.
- OGILVIE, G.K; TOMPKINS, M.B; TOMPKINS, W.A. Clinical and immunologic aspects of FeLV-induced immunosupresion. *Veterinary Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 287-296, 1988. OGILVIE, G.K; MOORE, A.S. Feline Oncology. A comprehensive guide to compassionate Care. *Veterinary Learning Sysytem*. v. 1, 503p., 2001.

- PEPIN, A.C.; TANDON, R.; CATTORI, V., et al. Cellular segregation of feline leukemia provirus and viral rna in leukocyte subsets of long-term experimentally infected cats. *Virus Research*, v. 127, p.9-16, 2007.
- POLANI, S; ROCA, A.L.; ROSENSTEEL, B.B et al. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, v. 405, n. 2, p. 397-407, 2010.
- POWERS, J.A.; CHIU, E.S.; KRABERGER, S.J., et al. Feline leukemia virus (FeLV) disease outcomes in a domestic cat breeding colony: relationship to endogenous FeLV and other chronic viral infections. *Journal of Virology*, v.92, p.1030, 2018.
- PRIHIRUNKIT, K; NARKKONG, N; SUNTAREE A. Acute monoblastic leukemia in a FeLV positive cat. *Journal of Veterinary Science*, vol 9. n. 1, p.109-111, 2008.
- QUACKENBUSH, S.L.; DONAHUE, P.R.; DEAN, G.A. et al. Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus felv-faids. *Journal of Virology*, v. 64, 5465-5474, 1990.
- QUACKENBUSH SL, DEAN GA, MULLINS JI, ET AL. Analysis of FeLV-FAIDS provirus burden and productive infection in lymphocyte subsets in vivo. *Virology*, v. 223p. 1–9, 1996.
- QUIGLEY, J.G., BURNS, C.C., ANDERSON, M.M., et al. Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia. *Blood*, v. 95, n. 3, p. 1093–1099, 2000.
- RASKIN, R.E.; MESSICK, J.B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Veterinary Clinical Small Animal*, v. 42(1):23-42, 2012.
- RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. Citologia de Cães e Gatos: atlas colorido e guia de interpretação. Brasil: Elsevier, 3ed. 530p. 2016.
- RECHE JÚNIOR A.; HAGIWARA M.; LUCAS S. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.24, n.3, p.152-155, 1997.
- RIGBY, M.A.; ROJKO, J.L.; STEWART, M.A. et al. Partial dissociation of subgroup C phenotype and in vivo behaviour in feline leukaemia viruses with chimeric envelope genes. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2839-2847, 1992.

ROJKO, J.L.; OLSEN, R.J. The immunobiology of the Feline Leukemia Virus. *Vet Immunol Immunopat*, v. 6, p. 107-165, 1984.

ROJKO, J.L.; HARDY, W.D. Feline leukemia vírus and other retroviruses. In: *The cat diseases and clinical management*, 2 ed. Churchill Livingstone, New York, p. 263-432, 1994.

ROSADO, R.C. Rastreamento virológico de carnívoros e caracterização genética viral. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. p. 69. 2019.

ROY-BURMAN, P. Endogenous elements: Partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses. *Virus Genes*, v. 11, n. 2-3, p. 147-161, 1995.

SHELTON, G.; GRANT, C.; COTTER, S. et al. Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infections and their Relationships to Lymphoid Malignancies in Cats: A Retrospective Study (1968-1988). *Journal of Acquire Immunodeficiency Syndromes*, v.3, n.6, p.623-630, 1990.

SHELTON, G.H., LINENBERGER, M.L. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin. Veterinary Medicine Surgery (Small Anim)*, v. 10, p. 220-233, 1995.

SHIMODA T, SHIRANAGA N, MASHITA T, et al. Bone marrow necrosis in a cat infected with feline leukemia virus. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.62, p.113-115, 2000.

SHIMODA T, SHIRANAGA N, MASHITA T, et al. Chronic myelomonocytic leukemia in a cat. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.62, p.195-197, 2000a.

SILVA, C.P.A. Detecção de FIV e FeLV em felídeos domésticos e silvestres naturalmente infectados e avaliação da metodologia de diagnóstico. Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Mato Grosso. 2016.

SOUTHARD, T.L.; FERNANDEZ, R.R.J.; PRIEST, H.; STOKOL, T. Holoprosencephaly and pure cell aplasia in a Feline Leukemia Virus-Positive kitten. *Journal of Comparative Pathology*, v. 154, p. 239-242, 2016.

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

- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2. ed. Iowa: Blakwell Publishing, 729p., 2008.
- STÜTZER, B.; MÜLLER, F.; MAJZOUB, M.; LUTZ, H.; GREENE, C.E.; HERMANN, W.; HARTMANN, K. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, n.1, p.192-197, 2010.
- STUTZER, B.; SIMON, K.; LUTZ, H. et al. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. *Journal of Feline Medicine Surgery*, v.13, p. 81-87, 2011.
- SWENSON, C.L.; KOCIBA, G.J.; O'KEEFE, D.A. et al. Cyclic hematopoiesis associated with feline leukemia virus infection in two cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 191, p.93-96, 1987.
- TANDOM, R.; CATTORI, V.; GOMES-KELLER, M.A. et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods*, v. 130, p. 124-132, 2005.
- TANDOM, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A. C. et al. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*, v. 135, n.1, p. 136-143, 2008.
- TASCA S, CARLI E, CALDIN M, et al. Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Veterinary Clinical Pathology*, v.38, p.2-12, 2009.
- TEIXEIRA, B.M.; RAJÃO, D.S; HADDAD, J.P.A et al. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.59, n.4, p.939-947, 2007.
- THRALL, M.A. et al. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Ed. Roca. p. 170–184, 2007.
- TIZARD, I. R. Linfócitos. In: *Imunologia Veterinária*. 9 ed. Elsevier, p. 286 – 303, 2014.
- TOMIYASU H., DOI A., CHAMBERS J. et al. 2018. Clinical and clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukaemia in six cats. *Journal of Small Animal Practice*, v.59, n.12, p.742-746, 2018.

- TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time pcr. *Virology* v.332, p.272-283, 2005.
- TUOMARI, D.L.; OLSEN, R.G.; SINGH, V.K.; KRAUT, E.H. Detection of circulating immune complexes by a clq/protein a-elisa during the preneoplastic stages of feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 7,p.227-238, 1984.
- VERBRAT, S.S.; RASHEED, S.; LUTZ, H. Feline oncarnavirus-associated cell membrana antigen: a viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology*, v. 124, p. 445-461, 1983.
- VILLEGAS, T.J. Ecologia, dinâmica populacional e aspectos sanitários de Gatos domésticos (*Feliscatus*) nas áreas adjacentes da unidade de conservação Parque Estadual Carlos Botelho, no estado de São Paulo, Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonozes. Universidade de São Paulo. p. 121, 2019.
- VICTOR, R.M.; BICALHO, J.M; ANDRADE, M.B. et al. Molecular detection of Feline leukemia virus in oral, conjunctival and rectal mucosae provides results comparable to detection in blood. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 58, n. 02, 2020.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.).Schalm's veterinary hematology. 6th ed.Ames:Willey-Blackwell. 1232 p, 2010.
- WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.).Schalm's veterinary hematology. 6th ed.Ames:Willey-Blackwell. 1232 p, 2011.
- WERNICKE, D.; TRAININ, Z.; UNGAR-WARON, H. et al. Humoral immune response of asymptomatic cats naturally infected with feline leukemia vírus. *Journal of Virology*, v. 60, n.2, p. 669-673, 1986.
- WESTMANN, M.E.; MALIK, R.; NORRIS, J.M. Diagnosing feline immunodeficiency vírus (FIV) and feline leucemiavírus (FeLV) infection: an update for clinicians. *Australian Veterinary Journal*, v. 97, n. 3, p. 47-55, 2019.
- WILLET, B.J; HOSIE, M.J. Feline Leukemia vírus: half a century since its discovery. *Veterinary Journal*, v. 195, n. 1, p. 16-23, 2013.
- WORKMAN, H.C.; VERNAU, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Veterinary Clinical SmallAnimal*, v.33, p.1379–1399, 2003.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação clínico-laboratorial, de medula óssea e linfonodo de gatos infectados pelo vírus da leucemia felina em diferentes classificações.", protocolo do CEUA: 122/2020 sob a responsabilidade de Paulo Ricardo de Oliveira Paes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 18/08/2020.

Vigência da Autorização	17/08/2020 a 16/08/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Gatos / Indiferente
Nº de animais	14
Peso/Idade	6kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Rotina do Hospital Veterinário da UFMG
*Espécie/linhagem	Gatos / Indiferente
Nº de animais	14
Peso/Idade	6kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Rotina do Hospital Veterinário da UFMG
*Espécie/linhagem	Gatos / Indiferente
Nº de animais	14
Peso/Idade	6kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Rotina do Hospital Veterinário da UFMG

Considerações posteriores:

18/08/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 17/08/2020. Validade: 17/08/2020 à 16/08/2025.
17/08/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 17/08/2020. Validade: 17/08/2020 à 16/08/2025.

Belo Horizonte, 23/07/2021.

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “**Avaliação de hemograma, perfil bioquímico, medula óssea e linfonodo de gatos infectados pelo vírus da leucemia felina**”.

Nome do pesquisador principal: Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes, Prof. Rodrigo dos Santos Horta.

Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais – Ciaep: 02.044.2019.

Objetivos do estudo: Esse estudo tem como objetivo identificar alterações hematológicas, bioquímicas e de linfonodos de gatos com diferentes formas da infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), visando não só o diagnóstico, mas melhorar a compreensão da doença e o tratamento.

Procedimentos a serem realizados com os animais: Serão incluídos gatos clinicamente hígidos, submetidos a anestesia geral para ovariohisterectomia ou orquiectomia eletiva. Aproveitando o procedimento anestésico necessário para as cirurgias supracitadas, será realizada a coleta de 2-3ml de sangue na veia jugular e ainda aspirados, utilizando agulha fina, de linfonodo e medula óssea. A coleta de medula óssea será realizada no cabeça do úmero, mediante tricotomia e antisepsia adequada.

Potenciais riscos para os animais: Os procedimentos realizados (coleta de sangue, linfonodo e medula óssea) são pouco invasivos e não oferecem riscos adicionais aos animais. Os riscos existentes são inerentes ao procedimento anestésico e cirúrgico (castração), conforme previstos por Fossum et al. (2008). Não haverá também aumento do tempo de anestesia nos animais incluídos nessa pesquisa.

Cronograma:

Atividades	Mar/Abr	Mai/Jun	Jul/Ago	Set/Out	Nov/Dez	Jan/Fev
Elaboração e aprovação do projeto no CEUA	X					
Realização da coleta	X	X	X	X		
Análise das amostras	X	X	X	X		
Tabulação dos dados			X	X		
Análise dos dados			X	X	X	
Redação			X	X	X	X
Publicação dos resultados					X	X

*Esse cronograma poderá ser alterado devido a pandemia atual (COVID-19).

Benefícios: Os pacientes incluídos nesse projeto se beneficiarão de exames hematológicos completos, bem como da pesquisa do antígeno p27, por meio do ELISA (SNAP Combo FIV/FeLV), e PCR para pesquisa do DNA proviral, permitindo o diagnóstico da FeLV e a identificação de alterações hematológicas e bioquímicas possivelmente relacionadas. Esses resultados serão repassados ao clínico, de acordo com o cronograma acima. Os resultados provenientes deste projeto serão redigidos em formato de artigos científicos e publicados em revistas científicas. A expectativa é de que este projeto produza ao final uma publicação em revista Qualis A ou B1. As informações provenientes do projeto também serão divulgadas para a comunidade científica da UFMG, na semana de iniciação científica e em outros eventos internos, mas também externamente em eventos de relevância na área.

Sua autorização para a inclusão do (s) seu (s) animal (is) nesse estudo é voluntária. Seu (s) animal (is) poderá(ão) ser retirado (s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele (s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo (s) seu (s) animal (is) será o (a) Prof. Rodrigo dos Santos Horta, inscrito (a) no CRMV sob o nº MG11669. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes e Dra. Mariana de Pádua Costa, também se responsabilizará pelo bem estar do(s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (31)3409 3349

E-mail: rodrigohorta@ufmg.br

Equipe: Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais da UFMG

Endereço: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, BH, MG).

Telefone: (31) 3409-2229

Declaração de consentimento: Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao (s) animal (is) pelo (s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu (s) animal (is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do (s) meu (s) animal (is) identificado (s), a seguir, neste projeto. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, MG, _____ de _____ de 2021

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome: _____

Documento de Identidade: _____ Identificação do (s) animal (is):

Nome: _____

Número de identificação: _____ Espécie: _____

Raça: _____