

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA

THIERRY GRIMA DE CRISTO

**EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA
LEUCEMIA (FeLV) E IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E CARACTERIZAÇÃO DA
MEDULA ÓSSEA DE GATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS**

LAGES
2022

THIERRY GRIMA DE CRISTO

**EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA
LEUCEMIA (FeLV) E IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E CARACTERIZAÇÃO DA
MEDULA ÓSSEA DE GATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS**

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Renata Assis Casagrande

LAGES, SC
2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Cristo, Thierry
EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA NO
DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA LEUCEMIA (FeLV) E
IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E CARACTERIZAÇÃO DA
MEDULA ÓSSEA DE GATOS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS / Thierry Cristo. -- 2022.
124 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Coorientador: Paulo Eduardo Ferian
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2022.

1. Medicina felina. 2. Retrovírus. 3. Mielopatia. 4. Aspirado
medular. I. Assis Casagrande, Renata. II. Eduardo Ferian,
Paulo. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro
de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal. IV. Título.

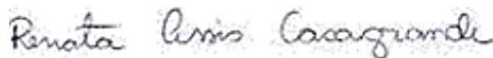
THIERRY GRIMA DE CRISTO

**EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA
LEUCEMIA (FeLV) E IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) E CARACTERIZAÇÃO DA
MEDULA ÓSSEA DE GATOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS**

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Renata Assis Casagrande

BANCA EXAMINADORA



Renata Assis Casagrande, Doutora
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:



Saulo Petinatti Pavarini, Doutor
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Documento assinado digitalmente
SILVIA DE ARAÚJO FRANÇA BAÊTA
Data: 13/02/2022 21:24:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Silvia de Araújo França Baêta, Doutora
Universidade Federal do Piauí (UFPI)



Mere Erika Saito, Doutora
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)



Rosângela Locatelli Dittrich, Doutora
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Lages, 11 de fevereiro de 2022.

A todos que acreditaram e contribuíram para essa pesquisa, dedico não só este trabalho, mas todo o meu carinho e minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, companheiro, irmão, amigos, colegas de trabalho e familiares por todo apoio, tal como agradeço a minha orientadora Renata Assis Casagrande pelo esforço para realização e conclusão dessa pesquisa, além das inúmeras conversas sobre a vida, sobre o amor à docência e a pesquisa.

Um agradecimento especial a Prefeitura de Lages e toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Lages, principalmente à médica veterinária Geanice Ledo, por todo o suporte e companheirismo, e aos colegas do Hospital de Clínicas Veterinárias por nos apresentar pacientes tão queridos. Aos professores Paulo Eduardo Ferian, meu coorientador, e Fabiano Zanini Salbego, pelos ensinamentos tão importantes para a realização das colheitas de medula óssea.

Um obrigado imenso a minha colega e amiga Giovana Biezus, que foi essencial para que esse projeto fosse realizado à perfeição. Agradeço também a Aline da Rosa Maciel, por todo auxílio nas colheitas e na realização das PCR, bem como a todos os bolsistas que já passaram por esse projeto.

Aos estagiários, pós-graduandos e amigos que fizeram e fazem parte do Grupo de Patologia Veterinária da UDESC: Marcela, Letícia, Laura, “Gustavos”, Taís, Fabio, “Leonardos”, Lucas, Jéssica, Gabriel, Stephane, “Joãos”, Tainah, Sara e todos os muitos passageiros do GPV.

A toda equipe do Laboratório Clínico Veterinário (LCV) da UDESC, a Professora Mere Erika Saito, aos residentes Mariângela, Mayara, Denilson, aos estagiários e pós-graduandos que se dispuseram a cuidar e analisar com tanto carinho as minhas centenas de amostras.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de fundos para esta pesquisa mediante aprovação do projeto em edital Universal nº 01/2016, processo: 407084/2016-9, e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de doutorado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Os vírus da leucemia (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) são dois dos mais importantes e debilitantes patógenos para a espécie felina, cujo diagnóstico se baseia principalmente em ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR). A imunocitoquímica (ICQ) anti-FeLV e anti-FIV é uma técnica direta e rápida, mas não há estudos que determinem a sua eficiência diagnóstica. Este trabalho objetiva padronizar e verificar a eficiência da técnica de imunocitoquímica de aspirados de medula óssea e comparar com as técnicas de ELISA e nested-PCR, e demonstrar as características da avaliação medular em animais clinicamente saudáveis. Foram selecionados 188 gatos, sem restrições quanto à raça, gênero, idade e condição de saúde, dos quais foram colhidas amostras de medula óssea para realização de ICQ anti-FeLV gp70 e anti-FIV p24 gag, e amostras de sangue total para realização de hemograma e testes de ELISA, para FeLV e FIV, e nested-PCR para FeLV. Foi realizado diferencial de 500 células nucleadas da medula óssea em maior aumento (x1000) e caracterização morfológica de acordo com o descrito em literatura. As informações obtidas foram distribuídas em tabelas de contingência, onde os dados hematológicos, medulares ósseos e epidemiológicos foram avaliados com estatística descritiva inferencial e a eficiência na detecção dos vírus, em cada método de diagnóstico utilizado, foi determinada pelo índice de concordância de Kappa Cohen. Dos 188 animais avaliados, 42% eram machos e 58% fêmeas, com idade média de 19,3 (\pm 17,57) meses. Para FeLV, 28,2% foram positivos em ao menos um dos testes, com 26,6% positivos na PCR, 18,1% na ICQ e 11,2% no ELISA, com concordância substancial para entre ICQ com ELISA ($k= 0,68$) e com o PCR ($k= 0,68$). Dos gatos testados para FIV, 4,3% foram positivos em ao menos um dos testes, com 3,2% positivos na ICQ, 0,5% no ELISA e 0,5% em ambos os testes, com concordância regular entre os testes ($k= 0,21$). Na avaliação quantitativa da medula óssea foram observados valores distintos do preconizado pela referência atualmente utilizada, em gatos clinicamente saudáveis com ou sem alterações hematológicas. Esse trabalho demonstra que a ICQ é uma técnica eficiente para o diagnóstico de FeLV e FIV a partir de amostras de medula óssea, além de apontar que a avaliação de medula óssea em gatos é subjetiva e requer uma avaliação global do estado do paciente.

Palavras-chave: Medicina felina, retrovírus, mielopatia, aspirado medular

SUMMARY

Feline Leukemia (FeLV) and Immunodeficiency virus (FIV) are two of the most important and debilitating pathogens in cats, whose diagnosis is mainly based on enzyme immunoassay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). Immunocytochemistry (ICC) anti-FeLV and anti-FIV is a direct and rapid technique, but there are no studies to determine its diagnostic efficiency. This work aims to standardize and verify the efficiency of the immunocytochemical technique of bone marrow aspirates and compare it with the ELISA techniques for FeLV and FIV and nested-PCR for FeLV diagnosis and demonstrate the characteristics of the bone marrow evaluation in clinically healthy animals. One hundred and eighty-eight cats were selected, without restrictions regarding race, gender, age and health, from which bone marrow samples were collected to perform ICQ anti-FeLV gp70 and anti-FIV p24 gag, and whole blood samples to perform blood count and tests of ELISA, for FeLV and FIV, and nested-PCR for FeLV. A differential of 500 nucleated bone marrow cells at higher magnification (x1000) and morphological characterization was performed as described in the literature. The information obtained was distributed in contingency tables, where hematological, bone marrow analysis, and epidemiological data were evaluated with inferential descriptive statistics, and the efficiency in virus detection, in each diagnostic method used was determined by the Kappa Cohen concordance index. Of the 188 animals evaluated, 42% were male and 58% female, with a mean age of 19,3 months. For FeLV, 28.2% were positive in at least one of the tests, with 26.6% positive in PCR, 18.1% in ICQ and 11.2% in ELISA, with substantial agreement for between ICQ and ELISA ($k= 0.68$) and with PCR ($k= 0.68$). Of the cats tested for FIV, 4.3% were positive in at least one of the tests, with 3.2% positive in ICQ, 0.5% in ELISA and 0.5% in both tests, with regular agreement between tests ($k= 0.21$). In the quantitative assessment of the bone marrow, values different from those recommended by the currently used reference were observed, in clinically healthy cats with or without hematological alterations. This work demonstrates that ICQ is an efficient technique for the diagnosis of FeLV and FIV from bone marrow samples, in addition to pointing out that the evaluation of bone marrow in cats is subjective and requires a global assessment of the patient condition.

Keywords: Feline medicine, retrovirus, myelopathy, marrow aspirate

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismos de inserção do vírus da FeLV na célula do hospedeiro: Após infiltrar-se na célula alvo, duplica sua fita simples de RNA com auxílio da transcriptase reversa e gera o provírus. Esse, por sua vez, se integra ao DNA do hospedeiro e se torna capaz de promover ou não alterações somáticas.
.....22
- Figura 2 - Técnica de acesso a medula óssea de gatos a partir da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo com cânulas ergonômicas no padrão Jamshidi 13G. .38
- Figura 3 - Amostras de medula óssea de gatos sobre as placas de Petri. Notar grandes conglomerados de espículas (setas) após a remoção do sangue excedente.
.....39
- Figura 4 - Técnica de preparo das extensões de medula óssea para imunocitoquímica (ICQ) anti-FeLV e anti-FIV em gatos. **A.** Captura das espículas da medula óssea depositadas na placa de Petri. **B.** Deposição das espículas na lâmina de vidro previamente preparada com silano. **C.** Compressão cruzada das lâminas. **D.** Extensões finalizadas, selecionadas e prontas para realização da ICQ.39
- Figura 5. Avaliação imunocitoquímica (ICQ) anti-FeLV (gp70) de medula óssea em gatos. A. Marcação intracitoplasmática fraca em precursores hematopoiéticos. B. Marcação moderada em cinco precursores hematopoiéticos. C. Marcação acentuada em múltiplos precursores hematopoiéticos. D. Marcação acentuada peri-espicular e intracitoplasmática em um megacariócito (seta) (Técnica do polímero ligado à peroxidase, DAB, x400).....46
- Figura 6. Avaliação imunocitoquímica (ICQ) anti-FIV (p24 gag) de medula óssea em gatos. A. Marcação intracitoplasmática em um único precursor hematopoiético com marcação intracitoplasmática. B. Marcação moderada em seis precursores hematopoiéticos (Técnica do polímero ligado a peroxidase, DAB, x400).....47
- Figura 7 - Técnica de colheita de amostra da medula óssea em gatos a partir da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo utilizando cânulas no padrão Illinois 13G.....66
- Figura 8 - Aspirado medular de um gato, inapto para avaliação devido à coagulação excessiva, com abundantes agregados de plaquetas (cabeça de seta), com citoplasma eosinofílico e granular [May Grunwald-GIEMSA (MGG), x400]. **Insert.** Aspecto macroscópico da placa de Petri após a deposição desta mesma amostra.....70

- Figura 9 - Aspirado de medula óssea hemodiluído, contendo abundante contaminação por sangue periférico (MGG, x100). **Insert.** Aspecto macroscópico da placa de Petri após a deposição desta mesma amostra.....70
- Figura 10 - Aspirado medular de um gato com hiperplasia eritroide. **A.** Notam-se rubriblastos (setas pretas) em moderada quantidade, seguidos por grande número de rubríctos (cabeças de seta preta) em diversas fases de maturação e amplo precursor granulocítico em processo de metáfase típica (cabeça seta vermelha) (x400). **B.** Imagem A aproximada, onde se nota proporção aumentada de rubriblastos (seta preta), prorrubríctos (cabeça de seta preta), e rubríctos em múltiplos estágios, em relação aos precursores granulocíticos, como mielócitos (seta vermelha) e neutrófilos bastonetes (cabeça de seta vermelha) (x1000) (MGG).75
- Figura 11 - Aspirado medular de um gato clinicamente saudável. Observar um mielócito basófilo (MB) ao lado de um mieloblasto (MBI) e de um mielócito neutrófilo (MN), acompanhados por duas células em processo mitótico de metáfase (cabeças de seta pretas) e múltiplos precursores eritroides e linfócitos (x1000, MGG).....81
- Figura 12 - Aspirado medular de dois gatos com linfocitose. **A.** Abundantes plasmócitos com membrana citoplasmática irregular, e citoplasma com margens intensamente eosinofílicas, caracterizando as *flame cells* (seta preta). **B.** Plasmócitos amplo, repleto por vesículas opticamente vazias e de tamanhos similares, caracterizando uma célula de Mott (seta preta) (MGG, x1000)..82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Contagem diferencial de células da medula óssea de gatos (n= 7) predeterminada por Jain (1993a).	68
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de gatos submetidos à investigação do vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) a partir das técnicas de imunocitoquímica (ICQ), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a faixa etária e o gênero.....	44
Tabela 2 - Resultados da detecção do vírus da leucemia felina (FeLV) de gatos pelas técnicas de imunocitoquímica (ICQ), reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com gênero e faixa etária.....	45
Tabela 3 - Avaliação da concordância entre os testes de imunocitoquímica (ICQ) de aspirados de medula óssea, reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue total e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de soro sanguíneo para o diagnóstico da infecção pelo vírus da leucemia (FeLV) em gatos.....	45
Tabela 4 - Valores obtidos no hemogramade 120 gatos clinicamente saudáveis submetidos à aspiração de medula óssea.	71
Tabela 5 - Análise descritiva da avaliação quantitativa dos aspirados de medula óssea com valores expressados em porcentagem (%) dos 120 gatos.	72
Tabela 6 - Valores de hemograma de 57 gatos sem alterações hematológicas submetidos à aspiração de medula óssea.	73
Tabela 7 - Análise descritiva da avaliação quantitativa dos aspirados de medula óssea de 57 gatos sem alterações evidentes em hemograma.	73
Tabela 8 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de dois gatos com quadro hematológico de anemia.....	74
Tabela 9 - Valores de hemograma de 28 gatos com leucocitose submetidos à aspiração de medula óssea.....	76
Tabela 10 - Padrões observados nos leucogramas de 28 gatos com leucocitose, clinicamente saudáveis, submetidos à aspiração de medula óssea.	76
Tabela 11 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 28 gatos com leucocitose, clinicamente saudáveis.	77
Tabela 12 - Valores de hemograma de 22 gatos com neutrofilia submetidos à aspiração de medula óssea.....	78

Tabela 13 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 22 gatos com neutrofilia, clinicamente saudáveis.	78
Tabela 14 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 23 gatos com eosinofilia, clinicamente saudáveis.	79
Tabela 15 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 12 gatos com monocitose, clinicamente saudáveis.	83
Tabela 16 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 17 gatos com quadro hematológico compatível com linfopenia, porém clinicamente saudáveis.	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV)	20
3.1.1 Ciclo biológico do FeLV: transmissão e formas de infecção	21
3.1.2 Aspectos históricos e clínicos da infecção por FeLV em gatos	23
3.1.3 Subgrupos virais do FeLV	25
3.1.4 Interação oncogênica.....	26
3.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)	26
3.2.1 Ciclo biológico do FIV: transmissão, infecção e quadro clínico.....	27
3.2.2 Neoplasias associadas ao FIV	27
3.3 TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DE FeLV E FIV	28
3.4 AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA: IMPORTÂNCIA E APLICABILIDADE.....	30
4 EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA LEUCEMIA (FeLV) E IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) EM GATOS A PARTIR DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA	32
4.1 INTRODUÇÃO	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2.1 Composição do estudo.....	36
4.2.2 Amostragem	37
4.2.3 Detecção de FeLV e FIV por ELISA.....	40
4.2.4 Extração de DNA e detecção do FeLV por nested-PCR.....	40
4.2.5 Imunocitoquímica anti-FeLV (anti-gp70) e anti-FIV (p24 <i>gag</i>)	41
4.2.6 Inquérito epidemiológico.....	42
4.2.7 Análise estatística	42
4.2.8 Comitê de ética e experimentação animal	43
4.3 RESULTADOS	43
4.4 DISCUSSÃO	47
4.5 CONCLUSÃO.....	52

4.6 REFERÊNCIAS.....	53
5 CARACTERIZAÇÃO DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA DE GATOS SEM ALTERAÇÕES CLÍNICAS E COM DIFERENTES CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	61
5.1 INTRODUÇÃO	63
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
5.2.1 Composição do estudo.....	64
5.2.2 Hemograma.....	65
5.2.3 Colheita e análise da medula óssea	65
5.2.4 Análise estatística	68
5.2.5 Comitê de ética e experimentação animal	69
5.3 RESULTADOS	69
5.3.1 Avaliação geral	69
5.3.2 Gatos sem alterações hematológicas	72
5.3.3 Gatos com anemia.....	74
5.3.4 Gatos com leucocitose	75
5.3.5 Gatos com neutrofilia.....	77
5.3.7 Gatos com basofilia	80
5.3.8 Animais com linfocitose	81
5.3.9 Gatos com monocitose.....	82
5.3.10 Gatos com leucopenia	84
5.3.11 Gatos com linfopenia	84
5.4 DISCUSSÃO	85
5.5 CONCLUSÃO.....	95
5.6 REFERÊNCIAS.....	96
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
APÊNDICES	115

1 INTRODUÇÃO

Os vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) são retrovírus de distribuição mundial com grande importância para a medicina felina. De forma geral, o FeLV tende a ser mais incidente em animais jovens e o FIV em animais adultos a idosos (SYKES e HARTMANN, 2014). Ambos os vírus estão relacionados com o desenvolvimento de inúmeras enfermidades secundárias ao quadro de comprometimento genético e imunológico desencadeado no animal, dentre elas estão os processos neoplásicos, em sua maioria de origem hematopoiética, e as doenças infecciosas bacterianas, protozoárias e fúngicas (HARTMANN, 2012a, 2012b; SELLON e HARTMANN, 2012; SYKES, 2014).

Devido à capacidade destes vírus se disseminarem por diversos órgãos as alterações clínicas associadas à infecção são inúmeras (HARTMANN, 2012a; SELLON e HARTMANN, 2012). Um dos principais focos de migração viral é a medula óssea, órgão com singular importância na manutenção da vida, dada à produção constante de células sanguíneas e imunológicas (HARVEY, 2012a; HARTMANN, 2012a, 2012b). As alterações que esses vírus promovem na medula óssea variam desde leucemias, linfomas, necrose e mielodisplasias associadas ao FeLV (SHIMODA et al., 2000; PRIHIRUNKIT et al., 2008; HISASUE et al., 2009; STÜTZER et al., 2010; HARVEY, 2012b), até alterações funcionais nos linfócitos, células dendríticas e da série granulocítica, no caso do FIV (TERRY et al., 1995; TANABE e YAMAMOTO, 2001; HARTMANN, 2011; HARTMANN, 2012a; SELLON e HARTMANN, 2012).

Como consequência, espera-se a ocorrência de alterações hematopoiéticas concomitantes à infecção, que vão desde anemias arregenerativas, leucocitoses com neutrofilia, linfocitose e/ou eosinofilia, até policitemia acentuada, produção exacerbada de precursores hematopoiéticos atípicos e leucopenias intensas e não regenerativas (SHELTON et al., 1990; MANDELL et al., 1992; LINENBERGER e ABKOWITZ, 1995; COLLADO et al., 2012; BIEZUS et al., 2019). Tanto as alterações em medula óssea, quanto as hematológicas secundárias, requerem atenção em pacientes com suspeita de diagnóstico positivo para FeLV ou FIV, sendo de grande importância a análise acurada dos resultados de hemograma e mielograma (LINENBERGER e ABKOWITZ, 1995; HARVEY, 2012a, 2012b; BIEZUS et al., 2019).

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é considerado o teste de eleição para o diagnóstico de FeLV, principalmente devido à sua praticidade e

capacidade de detectar a infecção durante a fase de viremia precoce. O teste permite detectar o antígeno viral p27 do FeLV circulante na corrente sanguínea, e pode ser realizado com sangue total, soro ou plasma (WILLETT e HOSIE, 2013). Apesar de prático, sabe-se que esse teste não consegue detectar animais fora da fase de viremia, limitando o diagnóstico das infecções regressivas (LEVY et al., 2008; HARTMANN, 2012b). Já o ELISA para detecção da infecção pelo FIV ocorre a partir da identificação de anticorpos contra o antígeno p24, entretanto, nas fases iniciais da infecção o teste tende a ser ineficiente, já que a produção de anticorpos é pequena e morosa (SELLON e HARTMANN, 2012).

Para o diagnóstico de animais na fase regressiva da infecção pelo FeLV, pode-se optar pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que busca identificar diretamente o DNA proviral inserido no material genético da célula hospedeira (WILLET e HOSIE, 2013). Entretanto, esse teste também pode demonstrar resultados falso-negativos, associados à capacidade mutagênica do agente (SYKES e HARTMANN, 2014). Para o FIV as limitações da PCR estão associadas à baixa carga viral ou a variabilidade genética, o que torna difícil a montagem de *primers* para os múltiplos subtipos virais (STEINRIGL e KLEIN, 2003). Além do ELISA e da PCR, também é possível utilizar a avaliação imuno-histoquímica (IHQ) anti-FeLV gp70 e anti-FIV p24 *gag*, que identifica partículas virais diretamente no tecido da medula óssea. O principal limitante da IHQ é a obtenção de material. Para esse exame, é necessário o tecido íntegro para diagnóstico, o que torna esse método mais factível para materiais provenientes de biópsias e necropsias.

Como alternativa à IHQ, existe a técnica de imunocitoquímica (ICQ), que pode ser realizada com material obtido por meio de punções de medula óssea e outros diversos tecidos (LEONARDO; BARDALES, 2020), e desta forma possibilita a sua execução em animais vivos, com ou sem enfermidades concomitantes. Apesar das vantagens imbuídas à ICQ, não há ainda uma técnica descrita e padronizada para o diagnóstico de FeLV e FIV, comparando a sua eficiência em relação às técnicas de ELISA e PCR, já descritas. Desta forma é importante investigar a eficiência deste método de diagnóstico e verificar a sua aplicabilidade para a determinação da infecção por FeLV e FIV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a eficiência da imunocitoquímica (ICQ) de punção de medula óssea na detecção dos vírus da leucemia (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV), comparando com ELISA e PCR, além de caracterizar o diferencial e a morfologia celular da medula óssea de gatos não-infectados e clinicamente saudáveis de acordo com as alterações observadas em hemograma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Validar a técnica de ICQ como método de diagnóstico da infecção por FeLV e FIV;
- b.** Comparar a eficiência da ICQ com as técnicas de ELISA e nested-PCR para diagnóstico da infecção por FeLV;
- c.** Comparar a eficiência da ICQ com a técnica de ELISA para diagnóstico da infecção por FIV;
- d.** Avaliar a medula óssea dos gatos e de acordo com as alterações observadas nos exames hematológicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os retrovírus estão entre os mais importantes patógenos promotores de enfermidades em animais da espécie felina, sejam elas de ordem neoplásica, mielodisplásica ou decorrentes de imunossupressão (HARTMANN, 2012a; SELLON; HARTMANN, 2012; SYKES; HARTMANN, 2014). Os dois representantes dessa família viral mais importantes para os gatos são os vírus da leucemia (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV). Animais infectados por esses vírus podem apresentar comportamentos distintos, desde quadros de imunossupressão intensos e persistentes, até neoplasias distintas, como linfomas, leucemias e sarcomas (REINACHER, 1989; BEATTY et al., 1998; HARTMANN, 2012a).

A condição clínica do animal infectado por esses retrovírus varia de acordo com o desenvolvimento da infecção e pode ser grave, com óbito em cerca de três anos devido as coinfeções, lesões irreversíveis nos precursores mieloides, entre outros (REINACHER, 1989; BEATTY et al., 1998; MORRIS e DOBSON, 2008; NELSON e COUTO, 2010; HARTMANN, 2012a).

3.1 VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV)

O vírus da FeLV é um RNA de fita simples, envelopado, do gênero γ -retrovírus, da família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, com distribuição mundial (HARTMANN, 2012a; SYKES e HARTMANN, 2014), que apresenta como característica a inserção do RNA viral no genoma do hospedeiro com consequente mutagênese no local de inserção. A primeira descrição do vírus ocorreu no início da década de 60, quando se identificaram partículas virais ligadas à membrana de linfócitos atípicos de um gato com linfoma (JARRET et al., 1964).

O FeLV possui a capacidade de replicar em múltiplos tecidos, incluindo folículos linfoides, medula óssea, glândulas e epitélio respiratório (HARTMANN, 2012b). Acredita-se que este vírus tenha se originado há séculos, partindo de uma mutação de um γ -retrovírus de roedores, o que explica os traços de ácidos nucleicos relacionados a um FeLV ancestral em gatos e felídeos selvagens da região da bacia do Mediterrâneo (WILLETT e HOSIE, 2013).

3.1.1 Ciclo biológico do FeLV: transmissão e formas de infecção

Experimentos conduzidos em momentos próximos à descoberta do vírus, demonstraram que a introdução de gatos infectados em meio a grupos de gatos hígidos e não infectados, para convívio ou reprodução, resultou na disseminação do vírus (RICKARD et al., 1969; BRODEY et al., 1970; JARRETT, 1972; JARRETT et al., 1973; WILLETT e HOSIE, 2013). Essas pesquisas pregressas permitiram determinar que a transmissão horizontal é a mais efetiva, e que o contato próximo entre os gatos é um fator determinante para a infecção (JARRETT et al., 1973; WILLETT e HOSIE, 2013).

O potencial de contágio do FeLV é muito alto, espalhando-se por meio do contato íntimo entre gatos portadores que estejam expelindo o vírus com gatos em condições de imunossupressão transitória ou persistente (HARTMANN, 2012b). A transmissão não ocorre somente a partir do contato de gatos que apresentam doença clínica, mas também, e talvez de forma mais importante, a partir dos que estão saudáveis e virêmicos (SELLON e HARTMANN, 2012).

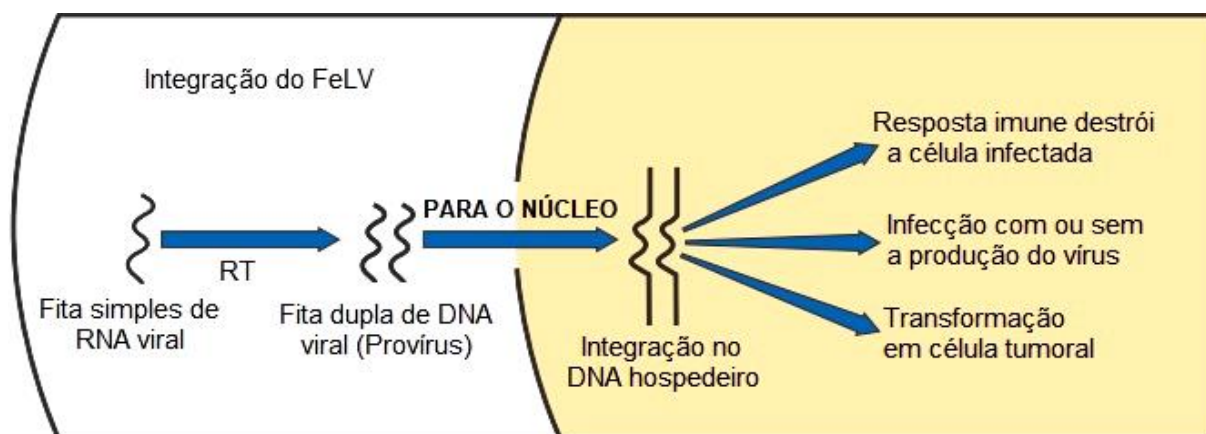
Há eliminação de milhares de partículas virais pela saliva dos gatos infectados e por isso arranhaduras e mordeduras nos confrontos intraespécie, o compartilhamento de bebedouros e comedouros, e os hábitos sociais e de higiene entre os gatos do mesmo núcleo social, são as principais formas de disseminação do vírus e também os principais meios de infecção (GOMES-KELLER et al., 2006; SELLON e HARTMANN, 2012; WILLETT; HOSIE, 2013).

Outras formas de transmissão, como pulgas, fezes e fômites já foram estudadas, porém, demonstram ter menor importância na rota de transmissão, tal como as formas iatrogênicas, por meio de agulhas contaminadas, instrumental médico e transfusões de sangue (PACITTI et al., 1986; VOBIS et al., 2005; SYKES e HARTMANN, 2014). Dentre os fatores de risco de maior importância para a infecção pelo FeLV, ressaltam-se o livre acesso à rua, ausência de medidas profiláticas vacinais, alta densidade populacional e estado reprodutivo e agressividade, na qual machos não castrados tendem a ser mais susceptíveis (GLEICH et al., 2009; BIEZUS et al., 2019a).

Após a infecção, o vírus infiltra-se primeiramente no tecido linfóide e nos macrófagos da orofaringe, sem necessariamente a expressão de sinais clínicos (ROJKO et al., 1979; HARTMANN, 2011; HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN,

2020). A transcriptase reversa (RT) transcreve o RNA em DNA proviral que se integra ao genoma das células (Figura 1). O provírus transcrito possui múltiplas e longas sequências repetidas (LTR) nas extremidades 3' e 5', controlando a expressividade dos genes virais. Como as infecções por retrovírus raramente provocam a morte celular, quando inserido no DNA o vírus se perpetua nas próximas gerações das células infectadas (HARTMANN, 2012a).

Figura 1 - Mecanismos de inserção do vírus da FeLV na célula do hospedeiro: Após infiltrar-se na célula alvo, duplica sua fita simples de RNA com auxílio da transcriptase reversa e gera o provírus. Esse, por sua vez, se integra ao DNA do hospedeiro e se torna capaz de promover ou não alterações somáticas.



Fonte: Adaptado de Hartmann (2012).

O FeLV pode apresentar tipos de infecção diferentes: progressiva, regressiva, abortiva e focal (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Quando a imunidade específica contra o vírus é insuficiente e sua replicação não é contida no início da infecção, irá se replicar no tecido linfóide e seguir para a medula óssea, epitélios de mucosas e glândulas, caracterizando uma infecção progressiva, na qual os animais costumam sucumbir às doenças associadas ao FeLV em poucos anos (ROJKO et al., 1979; LEVY et al., 2008). Gatos infectados de forma persistente permanecem em condição de viremia e sempre serão fontes de infecção, e é comum apresentarem testes positivos para detecção de antígenos específicos. O quadro de infecção persistente é mais comum em gatos jovens imunocomprometidos em decorrência da ineficiência do sistema imune em controlar a infecção; nesses casos a sobrevivência média é de 3,5 anos (LEVY et al., 2008; SYKES e HARTMANN, 2014).

Em contrapartida, se houver uma resposta imune eficaz que consiga antagonizar a infecção antes ou logo na chegada à medula óssea, o gato desenvolve uma infecção regressiva (HOOVER et al., 1976). Apesar de adquirir imunidade contra o vírus, situações de estresse imunológico que levem a um novo quadro de imunocomprometimento, podem ocasionar reativação do provírus latente (LEVY et al., 2008; SYKES e HARTMANN, 2014).

Não há replicação viral ou disseminação evidente do vírus nos gatos com infecção regressiva, entretanto, sempre serão portadores devido sua integração ao genoma (LUTZ et al., 1983; PACITTI, 1987; SYKES e HARTMANN, 2014). A chance de reativação viral é inversamente proporcional ao tempo após o primeiro contato com o agente, quanto mais tardia a tentativa de reativação, mais chances de insucesso irão existir, em decorrência de erros na decodificação genética viral (LEVY et al., 2008; MAJOR et al., 2010).

As formas abortiva e focal da infecção estão associadas a exposições sutis ao vírus e, nestes casos, o desenvolvimento de viremia é incomum. Essas duas formas de infecção raramente ocorrem naturalmente, sendo mais frequentes em inoculação experimental. Na forma abortiva há produção de anticorpos contra FeLV, capazes de combater o vírus e favorecer a sua eliminação do organismo, e na forma focal evidenciam-se resquícios do DNA viral somente em alguns tecidos, como baço, glândula mamária, intestino delgado e linfonodos (TORRES et al., 2005; MAJOR et al., 2010; SYKES e HARTMANN, 2014).

3.1.2 Aspectos históricos e clínicos da infecção por FeLV em gatos

Historicamente, o FeLV é considerado responsável por um número exorbitante de óbitos em decorrência da sua capacidade de desenvolver diversas síndromes clínicas distintas, principalmente, associadas a alterações das funções imunogênicas e hematopoiéticas (HARTMANN, 2011). Não obstante, ainda se supõe que cerca de um terço das neoplasias promotoras de morte em gatos estejam associadas à oncogênese induzida pelo vírus (ADDIE et al., 2000; HARTMANN, 2011).

O quadro clínico clássico de um felino infectado por FeLV é representado por episódios transitórios ou permanentes de imunocomprometimento, o que favorece a ocorrência de infecções secundárias, e alterações morfológicas e funcionais da medula óssea, o que pode levar a anemias arregenerativas e o desenvolvimento de

neoplasias, como linfomas e as leucemias (LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012b; CRISTO et al., 2019a, 2019b).

Antes do controle de FeLV, em meados de 1980, a sua relação com o desenvolvimento de linfomas alcançava cerca de 70% nos Estados Unidos da América (EUA) e até 60% em alguns países da Europa (HARDY, 1993). Com o advento das medidas profiláticas e controle populacional nos países desenvolvidos, esta relação se distanciou largamente (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; LUTZ et al., 2009; SCHERK et al., 2013; WILLETT e HOSIE, 2013; BEATTY, 2014).

Em 2003, a infecção por FeLV estava relacionada somente a 15% dos casos de linfoma nos EUA e cerca de 13% na Alemanha em 2012 (LOUWERENS et al., 2005; MEICHNER et al., 2012). Entretanto, em pesquisa recente no estado de Santa Catarina, constatou-se uma associação de 56,6% dos casos de linfoma em gatos com a infecção retroviral através de investigação imuno-histoquímica anti-FeLV direta, demonstrando que o controle da infecção na região ainda é precário e está diretamente ligado à qualidade e hábitos de vida dos gatos (CRISTO et al., 2019a).

Diferentes dos linfomas, as leucemias carecem de maiores estudos para determinar com exatidão qual o atual e verdadeiro impacto da infecção pelo FeLV no processo oncogênico a nível mundial. Na década de 70 estudos indicaram que a associação da infecção pelo FeLV com o desenvolvimento de leucemias mieloides alcançava cerca de 60 a 80% dos casos (ESSEX, 1982) e de leucemias linfoides em 68% dos casos (FRANCIS et al., 1979). O estudo mais atual no Brasil visando determinar essa associação encontrou positividade para FeLV em 78,38% das medulas ósseas com leucemia (CRISTO et al., 2019b).

Além das neoplasias podem ocorrer casos de atrofia de timo, linfopenia, neutropenia, alteração da função dos neutrófilos e perda progressiva da expressão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Devido a essas alterações todos os gatos infectados e com viremia persistente apresentam um grau elevado de imunocomprometimento, acentuando a ocorrência de enfermidades secundárias causadas por infecções oportunistas, tais como micoplasmose, toxoplasmose, esporotricose e criptococose (LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2011, 2012a).

Os principais sinais clínicos relatados em gatos FeLV positivos incluem palidez de mucosas, perda de peso associada à anorexia, letargia, desidratação, hipotermia, linfadenomegalia, dispneia e icterícia (COLLADO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016; BIEZUS et al., 2019b). Como achados laboratoriais, ressalta-se principalmente a

ocorrência de anemia, trombocitopenia e linfopenia, onde a anemia acontece com maior frequência em animais com doenças associadas à infecção (BIEZUS et al., 2019b).

3.1.3 Subgrupos virais do FeLV

Existem quatro subgrupos específicos do FeLV: A, B, C e T, todos imunologicamente relacionados (FIGUEIREDO et al., 2011). O subgrupo A é o único transmitido de forma horizontal, infectando linfócitos T CD4+, T CD8+ e LB na circulação sanguínea, nos linfonodos e na medula óssea, o que provoca um quadro grave de imunocomprometimento. Os demais subgrupos, B e C, podem evoluir a partir do subgrupo A por meio de recombinação gênica com um outro gene retroviral obtido por transmissão vertical (HARDY et al., 1976; JARRETT e RUSSELL, 1978).

O subgrupo T recebe essa denominação devido ao intenso tropismo por linfócitos T e forma-se a partir de uma mutação no gene *env* do FeLV tipo A, apesar de considerado de menor importância, é altamente citolítico, provocando quadros de intenso imunocomprometimento (LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012a; SYKES e HARTMANN, 2014).

Há íntima relação do subgrupo B com a ocorrência de linfomas tímicos e desordens mieloproliferativas. Já o subgrupo C, menos comum, está associado ao uso de um transportador heme denominado *Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1* (FLVCR-1) expresso em grandes quantidades em órgãos hematopoiéticos. Esse transportador atua como complicador na manutenção da defesa tóxica do grupo heme e altera a manutenção das unidades formadoras de colônias eritroides, o que promove a manifestação de hipoplasia eritroide severa e consequente anemia arregenerativa, ocasionalmente culminando com o óbito do animal em até dois meses (SHALEV et al., 2009).

Ocorre uma dependência dos subgrupos B e C pelo A, já que este é responsável pela evasão imune, promoção da replicação viral e resgate dos virions defeituosos de B e C para replicação (VAIL e KAREN, 2006; MORRIS e DOBSON, 2008). O FeLV tipo C está relacionado a anemia arregenerativa por alteração mielodisplásica (HARTMANN, 2012a).

3.1.4 Interação oncogênica

A inserção do material genético do vírus no genoma hospedeiro em regiões próximas a oncogenes celulares, levam a mutações genéticas somáticas que propiciam a clonagem de células anômalas onde há a integração do genoma viral, assim incidindo na formação das neoplasias (GHOSH e FALLER, 1999; FUJINO et al., 2008). Os sítios de integração comumente envolvidos no processo de ativação oncogênica para formação tumoral são *c-myc*, *flvi-1*, *flv-2*, *fit-1*, *pim-1* e *flit-1* (FUJINO et al., 2008).

O desenvolvimento de linfomas e leucemias está atrelado principalmente à capacidade de ativação e transcrição de genes celulares adjacentes ao provírus, o que está relacionado a componentes da região U3 do *Long Terminal Repeat* (LTR) do RNA viral (LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012b). Apesar disso, partículas virais já foram identificadas a partir de IHQ anti-FeLV em fibrossarcomas, meningiomas, osteossarcomas (OLIVEIRA REIS et al., 2017), ganglioneuroblastomas (PEREIRA et al., 2017) e carcinomas de células escamosas (REINACHER, 1989). Quadros leucêmicos relacionados ao vírus podem envolver tanto a linhagem mieloide, quanto a linhagem linfoide, e o início é majoritariamente agudo, porém, aponta-se que quadros de leucemia linfoide crônica são os mais comuns em animais FeLV positivos (WORKMAN e VERNAU, 2003).

3.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um RNA, pertence ao gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae*. Possui tropismo por linfócitos, em especial os do tipo T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e astrócitos (SELLON e HARTMANN, 2012). Atualmente, são conhecidos cinco diferentes subtipos: A, B, C, D e E, que são classificados de acordo com alterações de sequenciamento genético, sendo que o subtipo B é o mais prevalente no Brasil (MARTINS et al., 2008).

Existem muitas semelhanças entre o FIV e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), tanto na patologia e na estrutura molecular, quanto na sua ação no hospedeiro, que promove declínio gradual das células CD4⁺ (SELLON e HARTMANN, 2012). Essas características permitem que a infecção pelo FIV seja utilizada como modelo para o estudo da patogênese do HIV, bem como no desenvolvimento de

tratamentos terapêuticos e preventivos (ELDER et al., 2008; SELLON e HARTMANN, 2012).

3.2.1 Ciclo biológico do FIV: transmissão, infecção e quadro clínico

A transmissão do vírus ocorre tanto de forma horizontal, por meio da exposição de mucosas ao vírus, quanto na forma vertical, com transmissão materna pré ou pós-natal, devido à presença de partículas virais no colostro (O'NEIL et al., 1995).

A infecção aguda causa viremia primária e rápida linfopenia de linfócitos T, cursa com quadros de apatia, alterações de apetite, hipertermia e linfadenopatias. A infecção subclínica cursa com a estabilização dos linfócitos T e baixa viremia, perdurando por meses a anos. De forma similar à infecção por FeLV, no FIV há comprometimento da capacidade imunogênica do organismo, o que favorece a ocorrência de enterites, conjuntivites, infecções cutâneas, de cavidade oral e trato respiratório, assim como infecções por *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma haemofelis* (SYKES, 2014). Nesses casos, considera-se que houve progressão da doença, e desencadeia a denominada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina, conhecida como AIDS felina. Teratogênias e abortos podem ocorrer por intermédio da transmissão transplacentária, quando a gestação consegue perdurar, os neonatos são portadores assintomáticos e deficientes em linfócitos T (O'NEIL et al., 1995; OBERT e HOOVER, 2000).

Normalmente ocorre a morte antes do terceiro ano pós-desenvolvimento da doença, se não, leva a um quadro de viremia persistente com prognóstico ruim, configurada pelo desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas, linfomas e outras neoplasias (SELLON e HARTMANN, 2012; SYKES, 2014). Pode ocorrer perda da função hematopoiética quando o vírus infecta a medula óssea, utilizando as células reticulares do estroma como reservatório (TANABE e YAMAMOTO, 2001).

3.2.2 Neoplasias associadas ao FIV

Desde a descrição do FIV na década de 80 até os dias atuais, relatos associam a infecção com o desenvolvimento de neoplasias, onde predominam os linfomas e as leucemias (SELLON e HARTMANN, 2012; CRISTO et al., 2019a, 2019b). Células

linfoides neoplásicas infectadas foram observadas em medula óssea, fígado, rins, coração, pulmões, trato gastrointestinal, pâncreas, laringe, timo, olhos, sistema nervoso central e bexiga (BEATTY et al., 1998a, 1998b).

Mastocitomas, fibrossarcomas, adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas, são outras neoplasias que já foram associados ao FIV (BEATTY et al., 1998a, 1998b; MAGDEN et al., 2011). Apesar dos múltiplos relatos indicarem essa associação, diversos estudos de tecido tumoral de felinos FIV positivos não permitiram identificar se há e qual é a integração clonal do provírus do FIV com o desenvolvimento dos linfomas e/ou leucemias linfoides (CALLANAN et al., 1996; ENDO et al., 1997).

Em pesquisa prévia, detectaram-se sequências do vírus da FIV em DNA extraído de células de um linfoma em um gato infectado experimentalmente (BEATTY et al., 1998a, 1998b). Após análises adicionais, levantou-se a hipótese de que um gene do cromossomo B3 felino, realizava integração com o FIV, mais precisamente entre os éxons 3 e 4 (BEATTY et al., 2002).

Tanto o FIV quanto o HIV não possuem oncogenes na sua estrutura transcricional, entretanto, induzem a formação de tumores por meio de mecanismos oncogênicos não-agudos (MAGDEN et al., 2011). Esses mecanismos estão atrelados à ativação ou não-ativação de oncogenes celulares ou genes de supressão tumoral secundários, que interferem na transcrição celular e promovem a transformação neoplásica, o que pode ocorrer pela ampliação do gene, por mutações específicas, trocas de cromossomos e reordenação do código genético (MAEDA et al., 2008).

3.3 TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DE FeLV E FIV

Existem várias técnicas para o diagnóstico de FeLV e FIV, o ELISA e a PCR são as mais comuns. O ELISA para FeLV é capaz de detectar a infecção de forma precoce por meio da identificação do antígeno p27, sendo que o gato normalmente é positivo a partir do trigésimo dia pós-infecção, quando a viremia com consequente produção deste antígeno é alta. Como a viremia é variável entre os felinos, os gatos devem ser testados novamente em 30 dias caso o primeiro resultado seja negativo (LEVY et al., 2008). O ELISA para FIV é capaz de detectar anticorpos contra o antígeno p24 gag. A produção destes anticorpos se inicia em média em 60 dias pós-infecção, portanto, gatos podem ser indetectáveis quando testados próximos ao

momento da exposição inicial. Portanto, recomenda-se o testar novamente gatos negativos em 60 dias após o primeiro resultado negativo (LEVY et al., 2004, 2008).

A PCR, por sua vez, apresenta a vantagem de permitir realizar o teste com amostras de sangue total, medula óssea e aspirados de linfonodos, e pode determinar o gato como positivo mesmo antes da produção do antígeno p27, desta forma é importante para o diagnóstico de infecções na forma regressiva, que não são diagnosticadas pelo ELISA (HERRING et al., 2001; SELLON e HARTMANN, 2012). Apesar da alta efetividade para o diagnóstico de FeLV e FIV, resultados falso negativos podem existir na PCR, isto em decorrência da alta capacidade mutagênica dos retrovírus (SYKES e HARTMANN, 2014).

Dentre as formas menos convencionais de diagnóstico para FeLV e FIV, há a IHQ e a ICQ. A técnica de imuno-histoquímica detecta antígenos virais intracelulares diretamente em células infectadas pelos vírus. É considerado um dos melhores métodos de diagnóstico *post mortem* em tecidos fixados em formol, e permite identificar se as alterações anatomopatológicas estão relacionadas à infecção (REINACHER, 1989; JACKSON et al., 1993; SUNTZ et al., 2010). As principais células infectadas pelo FeLV são as mielomonocíticas da medula óssea, linfócitos T e macrófagos (ROJKO e OLSEN, 1984).

Estudos antigos apontam que a avaliação por IHQ da medula óssea é considerada suficiente para detectar uma infecção persistente pelo vírus em aproximadamente 100% dos gatos infectados (REINACHER, 1989). Um estudo experimental com inoculação de FeLV em 34 gatos hígidos, demonstrou que em 50% (17/34) o antígeno viral foi detectado uma semana antes na medula óssea, por meio de avaliação antígeno-específico no tecido, com relação à detecção no sangue (HOOVER et al., 1977).

Em estudo comparando ELISA, PCR e IHQ para o diagnóstico de FeLV em 70 gatos portadores de linfoma foi observado que 80% (56) foram positivos na PCR, 57% (40) na PCR e IHQ; 27% (19) no ELISA, PCR e IHQ; 10% (7) positivos na PCR e negativos no ELISA e IHQ e 1,4% (1) positivo apenas na IHQ (JACKSON et al., 1993). Outro estudo com 77 gatos com linfoma ou leucemia, foram detectados 39 casos positivos para FeLV simultaneamente por ELISA, PCR e IHQ, entretanto, dos 77, dois foram positivos unicamente por IHQ. Este estudo demonstra que a IHQ é um diferencial importante no diagnóstico do antígeno viral mesmo quando outras técnicas não são capazes de identificar o vírus (STÜTZER et al., 2011).

Quanto a ICQ, ainda não existem estudos sobre a aplicabilidade deste método diagnóstico para detecção da infecção por FeLV e FIV em gatos domésticos. Já foram realizadas avaliações ICQ de fibroblastos embrionados de pintinhos para detecção de genes p19gag e pp60V-sr de retrovírus aviários (STOKER e BISSELL, 1987) e em preparados com cérebros congelados de humanos para determinar a associação de encefalite multifocal de células gigantes com a infecção pelo HIV (BUDKA et al., 1987), e ambos demonstraram que o diagnóstico de infecções retrovirais por meio de ICQ é possível e apresenta resultados aparentemente confiáveis.

É importante também ressaltar que a ICQ, diferente da IHQ, é sempre passível de realização com o animal ainda vivo por punções aspirativas de tecidos neoplásicos e medula óssea (HARVEY, 2012a, 2012b).

3.4 AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA: IMPORTÂNCIA E APLICABILIDADE

A medula óssea é um órgão especializado na produção, maturação e liberação de componentes sanguíneos, e possui grande importância para a manutenção da vida principalmente após o nascimento, compondo juntamente com o sangue, um dos maiores órgãos do organismo (TRAVLOS, 2006; MYLONAKIS e HATZIS, 2014; STACY e HARVEY, 2017).

A avaliação deste órgão consiste na retirada de fragmentos cilíndricos de medula óssea por biópsia incisional, ou simplesmente na colheita de amostras a partir de aspirado intraósseo, o que é mais prático e menos traumático (HARVEY, 2012a). Esse exame não é dispendioso e a obtenção da amostra não é tão complexa quanto parece, capaz de ser facilmente obtida por profissionais treinados (MYLONAKIS e HATZIS, 2014).

As técnicas de colheita de amostras têm funções e metodologias distintas; para obtenção de amostras para biópsia incisional são utilizadas cânulas com calibres maiores, normalmente superiores a gauge 11 (11G), e com estilete acoplado ao mandril, que permitem abrigar a medula óssea em seu interior, posteriormente fixado em formol 10% para avaliação histopatológica (MÜLLER et al., 2009; HARVEY, 2012a; STACY e HARVEY, 2017). A avaliação histopatológica da medula preconiza examinar a composição estrutural do órgão, e permite verificar com eficácia alterações que envolvam fibrose ou substituição do tecido medular (TRICOT et al., 1984; HARVEY, 2012b).

Já o exame de medula óssea aspirada, também denominado de mielograma, tem grande utilidade na detecção de anormalidades sanguíneas, como neutropenias, leucopenias, leucocitoses e trombocitopenias persistentes; anemias arregenerativas prolongadas; policitemias de causa inexplicada; presença de células mieloides e linfoides atípicas circulantes; suspeitas de infiltrações neoplásicas na medula óssea; hipoproteinemias associadas à gamopatia mono ou policlonal; suspeitas de intoxicação por compostos químicos mielotóxicos; entre outras alterações (GRINDEM, 1989; TRAVLOS, 2006; MILLER e KATHARINE, 2007)

Ressalta-se que há poucas contraindicações para a realização da aspiração de medula óssea, visto que os riscos do exame estão relacionados principalmente com a sedação e a anestesia, e não com a colheita propriamente dita. Relata-se que a hemorragia após o acesso intraósseo pode ocorrer, mas com baixíssima frequência (MÜLLER et al., 2009; HARVEY, 2012a)

Apesar de incomuns as síndromes mielodisplásicas e as leucemias também ocorrem em animais, em especial nos da espécie felina, visto que os vírus de maior importância para esta espécie, FeLV e FIV, tem a característica de se infiltrar e replicar nas células hematopoiéticas (ROJKO et al., 1979; VALLI, 2007; HARTMANN, 2012a). Como já exposto previamente, o comportamento de mutagênese insercional do FeLV tem grande influência oncogênica nas células hematopoiéticas do hospedeiro, tornando-se o principal promotor das leucemias e dos linfomas nos gatos (LINENBERGER et al., 1995; CARMICHAEL et al., 2002; HARTMANN, 2012b). Em decorrência disso, nesta espécie há grande importância na avaliação da medula óssea quando as alterações hematológicas supracitadas forem observadas de forma persistente e o animal testar positivamente para FeLV e FIV (CARMICHAEL et al., 2002; HARVEY, 2012b).

4 EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS DA LEUCEMIA (FeLV) E IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) EM GATOS A PARTIR DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA

RESUMO

Os vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) são patógenos de grande importância para a medicina felina devido à sua associação com quadros de imunossupressão, anemias, mielodisplasias e com o desenvolvimento de linfoma e leucemia, cujo diagnóstico ainda é um desafio clínico constante, devido aos diversos cursos que a infecção pode tomar. Este estudo objetiva comparar a eficiência da ICQ de aspirados de medula óssea com ELISA e nested-PCR. Foram colhidas amostras de sangue e medula óssea e informações epidemiológicas de 188 gatos, independente de higiene, gênero e raça. As amostras foram separadas em alíquotas de sangue total para realização da nested-PCR para FeLV tendo como referência a região U3 LTR e o gene *gag* do FeLV A e soro para a detecção do antígeno p27 do FeLV e anticorpos contra antígeno p24 FIV por ELISA. As amostras de medula óssea foram colhidas na tuberosidade deltoide do úmero, dispostas em lâminas silanizadas para realização de ICQ anti-FeLV (gp70) e anti-FIV (p24 *gag*). Para comparação da eficiência entre as técnicas foi utilizado teste de concordância de Kappa Cohen. Para o delineamento das informações epidemiológicas foi realizada estatística descritiva. Dos gatos avaliados, 42% eram machos e 58% fêmeas, com idade média de 19,3 meses. Para FeLV, 28,2% foram positivos em ao menos um dos testes, com 26,6% positivos na PCR, 18,1% na ICQ e 11,2% no ELISA. Dos gatos testados para FIV, 4,3% foram positivos em ao menos um dos testes, com 3,2% positivos na ICQ, 0,5% no ELISA e 0,5% em ambos os testes. O teste de concordância de Kappa Cohen para diagnóstico de FeLV revelou moderada concordância entre ELISA e PCR e substancial entre ICQ e ELISA e entre ICQ e PCR. Já para o diagnóstico de FIV, o teste indicou concordância diagnóstica regular entre ICQ e ELISA. A ICQ foi eficiente e funcional para o diagnóstico de FeLV e FIV, capaz de ser uma nova ferramenta para identificação do *status* infectivo de gatos para esses vírus.

Palavras-chave: Imunodiagnóstico, medula óssea, medicina felina, citologia.

EFFICIENCY OF IMMUNOCYTOCHEMISTRY (ICQ) IN THE DIAGNOSIS OF FELINE LEUKEMIA (FeLV) AND IMMUNODEFICIENCY VIRUS (FIV) INFECTION FROM BONE MARROW ASPIRATES IN CATS.

ABSTRACT

Leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency (FIV) are important pathogens for cats due to their association with immunosuppression, anemia, myelodysplasia and the development of lymphoma and leukemia, whose diagnosis is still a constant clinical challenge, due to the different courses that the infection can take. This study aims to compare the efficiency of ICQ of bone marrow aspirates with ELISA and nested-PCR. Samples and epidemiological information were collected from 188 cats, regardless of health, gender and race. Samples were separated into whole blood aliquots to perform nested-PCR for FeLV, using the U3 LTR region and the FeLV A gag gene as a reference, and serum for detection of FeLV p27 antigen and antibodies against p24 FIV antigen by ELISA. Bone marrow samples were collected from the deltoid tuberosity of the humerus, placed on silanized slides to perform ICQ anti-FeLV (gp70) and anti-FIV (p24 gag). To compare the efficiency between the techniques, the Kappa Cohen agreement test was used. Descriptive statistics were used to outline the epidemiological information. Of the evaluated animals, 42% were male and 58% female, with a mean age of 19.3 months. For FeLV, 28.2% were positive in at least one of the tests, with 26.6% positive in PCR, 18.1% in ICQ and 11.2% in ELISA. Of the animals tested for FIV, 4.3% were positive in at least one of the tests, with 3.2% positive in ICQ, 0.5% in ELISA and 0.5% in both tests. The Kappa Cohen agreement test for FeLV diagnosis showed moderate agreement between ELISA and PCR and substantial agreement between ICQ and ELISA and between ICQ and PCR. As for the diagnosis of FIV, the test showed regular diagnostic agreement between ICQ and ELISA. ICQ is efficient and functional for the diagnosis of FeLV and FIV and is capable of being a new tool for identifying the infective status of cats for these viruses.

Keywords: Immunocytochemistry, bone marrow, feline medicine, cytology.

4.1 INTRODUÇÃO

Os vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) são dois dos patógenos mais importantes para os gatos. Ambos são RNA vírus de fita simples envelopados, constituintes da família Retroviridae (HARTMANN, 2012a; SELLON; HARTMANN, 2012). Esses dois retrovírus estão associados a uma infinidade de alterações clínicas altamente debilitantes, nas quais se incluem síndromes de imunodeficiência, alterações hematológicas e mielodisplásicas, além de neoplasias como linfoma e leucemia (BIEZUS et al., 2019a; CRISTO et al., 2019a, 2019b; WITHOEFT et al., 2019).

A infecção dos hospedeiros ocorre comumente por contato prolongado intraespécie, predominantemente, a partir da exposição de mucosas às partículas virais liberadas em secreções, leite e fezes de gatos infectados pelo FeLV, e em secreções e sangue de gatos infectados pelo FIV (OBERT; HOOVER, 2000; LEVY, 2008; HARTMANN, 2012a; SELLON; HARTMANN, 2012). Após o primeiro contato com o hospedeiro ocorre a distribuição dos vírus para tecidos ricos em macrófagos e linfócitos, e posteriormente migram pela circulação sanguínea para outros locais, incluindo medula óssea, baço e timo (HARTMANN, 2012a, 2012b; SELLON; HARTMANN, 2012).

O diagnóstico da infecção por FeLV e FIV é frequentemente realizado a partir de testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) (HARTMANN, 2012b; BURLING et al., 2017). Porém, outros métodos de diagnóstico estão disponíveis, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a imuno-histoquímica (IHQ) (MIYAZAWA; JARRETT, 1997; LURIA et al., 2004; ARJONA et al., 2007; SUNTZ et al., 2010; MÖSTL et al., 2015). A PCR é capaz de identificar a presença do material genético desses vírus independente do seu status replicativo, mas não permite determinar em que fase da infecção o animal se encontra (HARTMANN, 2012a).

A infecção pelo FeLV pode ocorrer de formas e em cursos distintos e como consequência, as técnicas necessárias para alcançar o diagnóstico podem variar amplamente (HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN, 2020). Gatos com quadros de infecção progressiva, aqueles em que há viremia persistente, são facilmente detectados a partir de testes rápidos comerciais baseados na técnica de ELISA, devido à presença das abundantes partículas do capsídeo viral (p27) circulantes (WESTMAN et al. 2019). Entretanto, apesar destes testes serem utilizados

ambulatorialmente de forma rotineira, resultados negativos podem ocorrer, pois a partir do momento em que o paciente apresenta uma resposta imune eficiente ao ponto de tornar a infecção latente, o curso clínico se torna regressivo (HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN, 2020).

O paciente com infecção regressiva não apresenta viremia e portanto, as partículas virais previamente detectadas não serão mais constantes na circulação, mantendo-se latentes em células da medula óssea, o que culmina em resultados falso-negativos por ELISA. Em decorrência dos riscos de reativação viral por múltiplos fatores, incluindo fatores estressivos e imunocomprometedores, existe a necessidade explícita de determinar se o paciente é ou não portador da infecção (LUTZ et al. 2009; HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN, 2020). Preconiza-se então para pacientes que tiveram resultados negativos no ELISA, a busca do DNA proviral no genoma do hospedeiro, mediante a utilização da PCR. É importante ressaltar que a PCR é capaz de identificar tanto o vírus em latência, quanto o circulante, e demonstra alta eficiência no diagnóstico da infecção tanto na forma progressiva, como regressiva, o fator limitante à sua utilização é o custo e a disponibilidade, principalmente em países em desenvolvimento (LUTZ et al. 2009; HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN, 2020; HOFMANN-LEHMANN; HARTMANN, 2020).

Inúmeros estudos verificaram a eficiência e a concordância entre os testes mais amplamente utilizados para FeLV, ELISA e PCR, com múltiplos resultados diferentes (JACKSON et al., 1996a; MIYAZAWA; JARRETT, 1997; HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; ARJONA et al., 2007; LIU et al., 2016; BEALL et al., 2019). Em grande parte, estes estudos concordam com a necessidade da utilização de mais de uma técnica diagnóstica para determinar de forma concisa a infecção por esses retrovírus (MIYAZAWA; JARRETT, 1997; ARJONA et al., 2007; BEALL et al., 2019; HARTMANN, 2012b; HARTMANN; HOFMANN-LEHMANN, 2020).

A infecção pelo FIV segue um curso distinto do FeLV, passa do estágio agudo, para o subclínico e o estágio clínico, no qual há desenvolvimento de imunossupressões e com ocorrência de doenças associadas. O ELISA para FIV tem como objetivo identificar anticorpos circulantes e, portanto, é capaz de identificar a infecção em todas as fases de desenvolvimento, o principal complicador está associado ao fato que animais negativos para FIV por ELISA, mesmo que testem negativos também no PCR, não podem ser considerados verdadeiramente negativos, permanecendo em “*status* infectivo não determinado” (LITTLE et al., 2019; WESTMAN

et al., 2019). Essa dificuldade diagnóstica está relacionada principalmente com a variabilidade genética do vírus e com a inserção de cepas importadas de áreas geograficamente distintas (FRANKENFELD et al., 2019; LITTLE et al., 2019) e a produção de anticorpos, que pode ser insuficiente ou até mesmo tardia (LITTLE et al., 2019).

A IHQ, por sua vez, permite detectar a proteína gp70 do envelope viral do FeLV e a proteína gp24 *gag* do capsídeo do FIV, e pode ser realizada a partir de cortes histológicos de tecidos (PENA et al., 2017; WEISS, 2010). Apesar de possuir grande utilidade, a obtenção de amostras para realização desta técnica é limitada, normalmente atrelada ao diagnóstico em órgãos colhidos em necropsias (JACKSON et al., 1996b; WEISS, 2010; CRISTO et al., 2019b; LEITE-FILHO et al., 2019).

Semelhante a IHQ, há a imunocitoquímica (ICQ), uma técnica cujo objetivo é a identificação de partículas virais no interior de células infectadas, porém, com maior facilidade na obtenção de amostras, e pode ser realizada com material fresco, colhido por esfoliação dos tecidos, punções de neoplasmas e até mesmo de medula óssea (OSAMURA, 1989; LEONARDO; BARDALES, 2020). Para FeLV e FIV, a utilização desta técnica ainda não foi completamente descrita, assim, este trabalho objetiva avaliar a técnica de imunocitoquímica para diagnóstico de FeLV e FIV em amostras de medula óssea obtidas a fresco e a comparação dos resultados destas análises com testes de ELISA e PCR para verificar sua eficiência como método de diagnóstico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Composição do estudo

O tamanho da amostra necessária para o estudo foi calculado com auxílio do Software R (*Foundation for Statistical Computing*, Package EpiCalc, Vienna, Austria) (THRUSFIELD, 2004), com uso da fórmula de amostragem aleatória simples para populações infinitas, considerando a prevalência esperada para FeLV de 22,26% (BIEZUS et al., 2019b) e o erro máximo aceitável na estimativa de 0,05. O número mínimo de gatos amostrados de forma randômica sistemática foi de 188.

Foram colhidas amostras de sangue e medula óssea dos 188 gatos selecionados de forma randômica entre os meses de abril a dezembro de 2019. Destes, 180 eram provenientes da rotina de atendimentos e castração do Centro de

Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde e oito da rotina de atendimentos clínicos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), ambos situados no município de Lages/SC, Brasil. Não houve restrição quanto ao gênero, idade, raça e estado de higiene dos animais, e a participação no estudo foi dependente do consentimento e autorização do tutor ou responsável temporário pelo paciente (Apêndice A1-2).

4.2.2 Amostragem

A colheita de sangue foi realizada a partir de venopunção jugular e a amostra foi acondicionada em tubos com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico. Posteriormente duas alíquotas de 1 mL de sangue total e duas alíquotas variando entre 0,5 e 1 mL de soro foram acondicionadas em microtubos e armazenadas a -80 °C.

A colheita de medula óssea foi realizada no momento da castração dos gatos no CCZ e durante procedimentos ambulatoriais no HCV. Os pacientes eram mantidos em anestesia com cetamina e xilazina por via intramuscular (IM) nas doses de 10 mg/kg e 1,5 mg/kg, respectivamente. Antecedendo a anestesia, eram aplicados também tramadol IM na dose de 2 mg/kg e penicilina benzatina IM na dose de 24 mg/kg. O acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes foi realizado pela equipe clínica durante as primeiras seis horas. Após esse período o paciente recebia alta-médica, recomendando-se avaliação comportamental pelo responsável e, em caso de alterações associadas aos procedimentos cirúrgicos o retorno imediato.

Antes do acesso ósseo, o paciente era posicionado em decúbito lateral direito e era realizada a inspeção da face cranial do ombro para localização da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo. Após a perfeita delimitação da área de inserção da cânula, preparo do local com tricotomia ampla e antisepsia com digliconato de clorexidina a 2% e álcool 70%, e era realizada uma pequena incisão cutânea de aproximadamente 0,3 cm com auxílio de uma lâmina de bisturi número 24.

Para acesso ao canal medular foram utilizadas cânulas ergonômicas padrões Jamshidi com ponta trifacetada e Illinois com ponta em bisel, ambas com sistema de fechamento *Luer-Lock*, em tamanhos 16G (0BIL1617/080® e BIL1617®, Biomedical Srl, Firenze, Itália), para animais com peso inferior a 1,5 kg, e 13G (0BLT 1310® e BIL1310®, Biomedical Srl, Firenze, Itália), com peso superior a 1,6 kg.

As cânulas eram levemente pressionadas na cortical do úmero e rotacionadas em ângulo de 90° repetidas vezes para ambos os lados até a perda da resistência à pressão (Figura 2). Realizava-se então o teste de estabilidade mediante a retirada do mandril, se estável procedia-se a colheita de amostras, do contrário aprofundava-se a cânula até a manutenção da estabilidade.

Figura 2 - Técnica de acesso a medula óssea de gatos a partir da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo com cânulas ergonômicas no padrão Jamshidi 13G.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A aspiração medular era realizada com auxílio de uma seringa de 10 mL preparada com 0,1 mL de EDTA dissódico a 4%, preconizando a obtenção de uma quantidade mínima de 0,3 mL e máxima de 0,8 mL de medula óssea por gato. Após a obtenção da mesma da amostra, a mesma era depositada e distribuída por todo o compartimento interno de uma placa de Petri medindo 5,5 cm de diâmetro por 1,3 cm de altura, contendo 0,3 mL de EDTA dissódico a 4% (Figura 3).

Com auxílio de tubos capilares eram selecionadas e capturadas entre cinco a oito espículas medulares (Figura 4A). As espículas eram então depositadas sobre seis lâminas de vidro previamente preparadas com 3-aminopropiltietoxisilano (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, EUA) (Figura 4B), duas para ICQ anti-FeLV, duas para ICQ anti-FIV e duas como controle negativo para ambos os testes. Para o preparo de cada extensão citológica, utilizava-se compressão cruzada entre as lâminas de vidro (técnica de *Squash*) (Figura 4C) e posterior fixação ao ar, seguida por fixação em metanol puro para análise (P.A.) por 20 minutos. Uma das duas

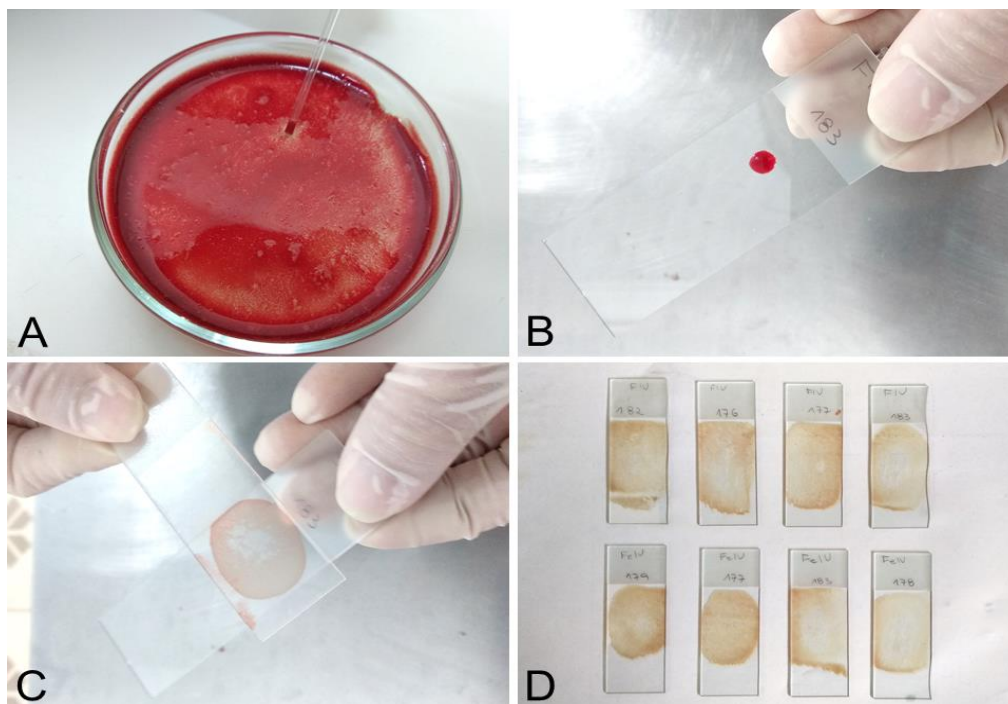
lâminas para cada análise era selecionada de forma aleatória para reação de ICQ (Figura 4D) e a remanescente era mantida como reserva em metanol P.A. por até 24 horas.

Figura 3 - Amostras de medula óssea de gatos sobre as placas de Petri. Notar grandes conglomerados de espículas (setas) após a remoção do sangue excedente.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 4 - Técnica de preparo das extensões de medula óssea para imunocitoquímica (ICQ) anti-FeLV e anti-FIV em gatos. **A.** Captura das espículas da medula óssea depositadas na placa de Petri. **B.** Deposição das espículas na lâmina de vidro previamente preparada com silano. **C.** Compressão cruzada das lâminas. **D.** Extensões finalizadas, selecionadas e prontas para realização da ICQ.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.2.3 Detecção de FeLV e FIV por ELISA

Para realização do teste de ELISA utilizou-se o kit SNAP® FIV/FeLV *Combo Test* (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, EUA), e os procedimentos para realização da análise foram seguidos conforme as instruções fornecidas pelo fabricante, em amostras de soro congelados a -80 °C, após descongelamento e homogeneização com agitação vibracional por cerca de 30 segundos.

4.2.4 Extração de DNA e detecção do FeLV por nested-PCR

O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue total previamente armazenadas a -80 °C, descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas por agitação vibracional por 30 segundos. Para extração foi utilizado o kit comercial GenElute™ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada a partir da utilização de espectrofotômetro NanoDrop™-2000/2000c (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Para detecção de DNA proviral foi utilizada a técnica de nested-PCR adaptada de Miyazawa e Jarret (1997). O DNA proviral do FeLV foi amplificado com base na região U3 LTR e o gene *gag* de um FeLV do subgrupo A. Foram utilizados os primers externos: U3-F (1): 5'-ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC-3' e G-R (1): 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3' e os primers internos U3-F (2): 5'-GCTCCCCAGTTGACCAGAGT-3'; G-R (2): 5'-GCTTCGGTACCAACCGAAA-3' (MIYAZAWA; JARRETT, 1997).

Para preparo do *mix* adicionaram-se primers, dNTP, água livre de nucleases e os reagentes do Kit Taq DNA Quatro G® (Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil), de acordo com as instruções informadas pelo fabricante. As condições utilizadas para a reação em termociclador foram: desnaturação a 94 °C por 5 minutos; anelamento a 94 °C por 1 minuto, 54,9 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto para os primers externos repetidos 35 vezes; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para a segunda reação, 1 µL do produto da primeira reação foi submetido as mesmas condições de tempo e temperatura, a exceção do anelamento, que para os primers internos foi de 50,8 °C.

Para todos os ensaios foi utilizado como controle positivo DNA proveniente de uma amostra de sangue de um felino testado positivamente para FeLV por meio de nested-PCR cedida pelo laboratório de virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O controle negativo consiste em todos os reagentes do *mix* e 1 µL de água livre de nucleases.

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% submerso em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). As amostras positivas da primeira reação (primers externos) produziram segmentos de DNA com 770 pares de base (pb) e da segunda reação (primers internos), produtos com 601 pb.

4.2.5 Imunocitoquímica anti-FeLV (anti-gp70) e anti-FIV (p24 *gag*)

As lâminas citológicas de medula óssea previamente confeccionadas e fixadas em metanol foram dispostas paralelamente em uma jarra de Coplin com oito espaços preenchida por água destilada. Em sequência, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio P.A. diluído a 10% em metanol P.A. em temperatura ambiente. Foi realizada a recuperação do antígeno gp70 do FeLV como tampão Tris-EDTA pH 9, e recuperação do antígeno p24 *gag* do FIV, com tampão citrato pH 6. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado em leite desnatado em pó (Molico®, Nestlé S.A., Araçatuba, Brasil) a 5% em água destilada por 20 minutos.

Os anticorpos primários utilizados foram anti-gp70 (monoclonal, AbD Serotec, Kidlington, UK) para FeLV e anti-p24 *gag* (monoclonal, AbD Serotec, Kidlington, UK) para FIV, ambos diluídos na proporção de 1:500 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), incubados em câmara úmida por 1h 30min em estufa a 37,5° C. As lâminas foram submetidas à incubação com kit sonda-polímero MACH 4 HRP universal (Biocare Medical, Concord, California, EUA) durante 15 minutos na primeira etapa (sonda) e 30 minutos na segunda etapa (polímero). A revelação foi realizada com 3,3'-diaminobenzidina (Cromógeno DAB, Dako, Glostrup, Denmark) e contracolorados com Hematoxilina de Harris.

Controles positivos para FeLV e FIV foram confeccionados a partir de cortes histológicos de 3 µm de blocos de parafina, previamente testados como positivos por IHQ. Esses cortes foram desparafinados, reidratados e inseridos simultaneamente às lâminas de medula óssea no momento do bloqueio da peroxidase endógena. Como

controle negativo foram incubadas extensões de medula óssea com PBS estéril, ao invés de anticorpo primário.

As amostras foram consideradas positivas quando observada marcação intracitoplasmática intensa, refringente e brilhante em tom castanho amarronzado, e negativas na ausência deste, desconsiderando fundo e impregnações de cromógenos em áreas com intensos agregados celulares. A quantidade de marcação positiva foi avaliada de acordo com o número médio de células marcadas por campo de maior aumento (x400) ao redor das espículas. Essa intensidade foi classificada em fraca (menos de 2 células marcadas por campo), moderada (entre 3 a 9 células) e acentuada (quando 10 ou mais células se apresentavam marcadas).

4.2.6 Inquérito epidemiológico

As informações epidemiológicas dos gatos foram obtidas mediante preenchimento de um questionário (Anexo B), com objetivo de identificar fatores que podem estar relacionados com a infecção por FeLV e FIV. Foram coletados dados sobre gênero, idade, origem, castração, acesso à rua, número de gatos na mesma habitação, histórico do animal, condição corporal, presença de doenças prévias ou em ocorrência.

Quanto ao gênero foram classificados em macho ou fêmea, inteiros ou castrados; e quanto à idade os animais foram classificados em filhote (0 a 6 meses), jovem (7 a 35 meses), jovem adulto (36 a 83 meses), adulto (84 a 131 meses), adulto idoso (132 a 179 meses) e idoso (acima de 180 meses) de acordo com as diretrizes de estágios de vida para animais da espécie felina da *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) e a *American Animal Hospital Association* (AAHA) (VOGT et al., 2010) adaptada em meses.

4.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram compilados em planilhas no Software Excel® (2019) para posterior análise estatística descritiva e inferencial, com auxílio dos softwares estatísticos SigmaPlot® versão 12.0 (Systat Software, Inc., EUA) e GraphPad Prism® versão 8 (GraphPad Software, La Jolla, California, EUA). Para associar as informações epidemiológicas obtidas no inquérito com a positividade para FeLV e FIV foram realizadas análises estáticas descritivas.

A eficiência dos três métodos de diagnósticos (ELISA, PCR e ICQ) foi calculada da seguinte forma: a análise estatística foi realizada por meio do método de Kappa Cohen, que estabelece o índice de concordância entre as técnicas de diagnóstico. A concordância é classificada e denominada de acordo com Landis e Koch (1977) em que: <0 = nenhuma concordância; valores entre $0 - 0,19$ = concordância baixa; valores entre $0,20 - 0,39$ = concordância regular; valores entre $0,40 - 0,59$ = concordância moderada; valores entre $0,60 - 0,79$ = concordância substancial; valores entre $0,80 - 1,00$ = concordância alta.

4.2.8 Comitê de ética e experimentação animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UDESC, com o número de registro 2306130319 (ID 000831) (Apêndice C).

4.3 RESULTADOS

Dos 188 gatos avaliados neste estudo, 42% (79/188) eram machos, destes, 5% (4/79) castrados, e 58% (109/188) eram fêmeas, das quais 9,2% (10/109) eram castradas, todos sem raça definida (SRD). A idade média total era de 19,3 meses ($\pm 17,57$). A média de idade dos gatos machos foi de 16,1 meses ($\pm 15,3$) e das fêmeas 21,6 meses ($\pm 17,6$). A composição dos grupos com relação ao gênero e as faixas etárias está descrita na Tabela 1.

Dos gatos avaliados foram obtidas informações epidemiológicas de 73% (137/188), enquanto os demais 27% (51/188) estavam acompanhados por familiares ou conhecidos dos tutores, que não possuíam conhecimento dos dados referentes a origem, hábitos e higidez do paciente, e optaram por não responder ao questionário epidemiológico. Ressalta-se que 73% (100/137) dos gatos possuíam livre acesso à rua, destes nenhum estava imunizado, bem como 73% (100/137) gatos conviviam com outros animais da mesma espécie, com lotação variando entre 1 a 23 animais (\bar{x} 4,09; $\pm 4,91$). Ainda, 10% (10/100) desses animais compartilhavam bebedouros, comedouros e caixas higiênicas, e 30% (30/100) apresentavam comportamento agressivo com gatos coabitantes.

Apesar de não haver distinção entre a condição de higidez dos gatos, somente três apresentavam doença clínica em curso, dois casos de infecção concomitante por *Mycoplasma* sp. e um caso de gengivite discreta.

Tabela 1 - Número de gatos submetidos à investigação do vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) a partir das técnicas de imunocitoquímica (ICQ), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a faixa etária e o gênero.

Faixa etária	Macho		Fêmea		Total					
	n	% ¹	n	% ¹	n	% ²	Média ²	D.P. ²	Min. ²	Máx. ²
Filhotes	13	16,5	18	16,5	31	9	5,4	0,6	4	6
Jovens	62	78,5	68	62,4	130	75	15,4	6,5	7	30
Jovens adultos	2	2,5	21	19,4	23	13,8	46,7	11,4	36	72
Adultos	2	2,5	2	1,8	4	2,1	96	13,8	84	108

¹ Total de animais componentes da faixa etária; ² Valores calculados com base na idade dos animais em meses. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Dentre os gatos testados, 28,2% (53/188) foram positivos para FeLV em ao menos um dos três testes utilizados (ICQ, ELISA e nested-PCR), sendo 51,0% (27/53) machos e 49% (26/53) fêmeas, entre 4 e 84 meses de idade (\bar{x} 20; \pm 14,5). Quanto à positividade de acordo com o exame realizado, 26,6% (50/188) foram positivos pela nested-PCR, 18,1% (34/188) pela ICQ e 11,2% (21/188) por ELISA.

Gatos positivos mutuamente para ICQ e nested-PCR totalizaram 17% (32/188), ou seja, 64% dos positivos pela nested-PCR, também foram positivos pela ICQ. Quanto aos resultados mútuos para ICQ e ELISA, foram 10,6% (20/188), indicando que 58,8% dos gatos positivos no teste de ICQ também foram positivos pelo ELISA. E por fim, resultados mútuos entre ELISA e nested-PCR também totalizaram 10,6% (20/188) casos, indicando que em 40% dos positivos por PCR também houve positividade por ELISA. A positividade para FeLV de acordo com o gênero e faixa etária estão descritos na Tabela 2.

Quanto aos resultados do coeficiente de Kappa Cohen para as técnicas de diagnóstico de FeLV avaliadas em pares foi observada concordância substancial entre ICQ e ELISA ($k=0,68$) e entre ICQ e PCR ($k=0,68$) e concordância moderada entre ELISA e PCR ($k=0,48$), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 2 - Resultados da detecção do vírus da leucemia felina (FeLV) de gatos pelas técnicas de imunocitoquímica (ICQ), reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com gênero e faixa etária.

Faixa etária		ICQ		Nested-PCR		ELISA	
		+	-	+	-	+	-
Total (n= 188)	Filhotes (n= 31)	3	28	6	25	0	31
	Jovens (n= 130)	27	103	36	94	20	110
	Jovens adultos (n= 23)	3	20	7	16	0	23
	Adultos (n= 4)	1	3	1	3	1	3
Machos (n= 79)	Filhotes (n= 13)	2	11	4	9	0	13
	Jovens (n= 62)	14	48	19	43	9	53
	Jovens adultos (n= 2)	1	1	1	1	0	2
	Adultos (n= 2)	1	1	1	1	1	1
Fêmeas (n= 109)	Filhotes (n= 18)	1	17	2	16	0	18
	Jovens (n= 68)	13	55	17	51	11	57
	Jovens adultos (n= 21)	2	19	6	15	0	21
	Adultos (n=2)	0	2	0	2	0	2

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 3 - Avaliação da concordância entre os testes de imunocitoquímica (ICQ) de aspirados de medula óssea, reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue total e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de soro sanguíneo para o diagnóstico da infecção pelo vírus da leucemia (FeLV) em gatos.

Testes comparados	Resultados dos testes				Análise de Concordância (K)
	+ / +	+ / -	- / +	- / -	
ICQ / ELISA	20	14	1	153	0,68
ICQ / PCR	32	2	19	135	0,68
ELISA / PCR	20	1	30	137	0,48

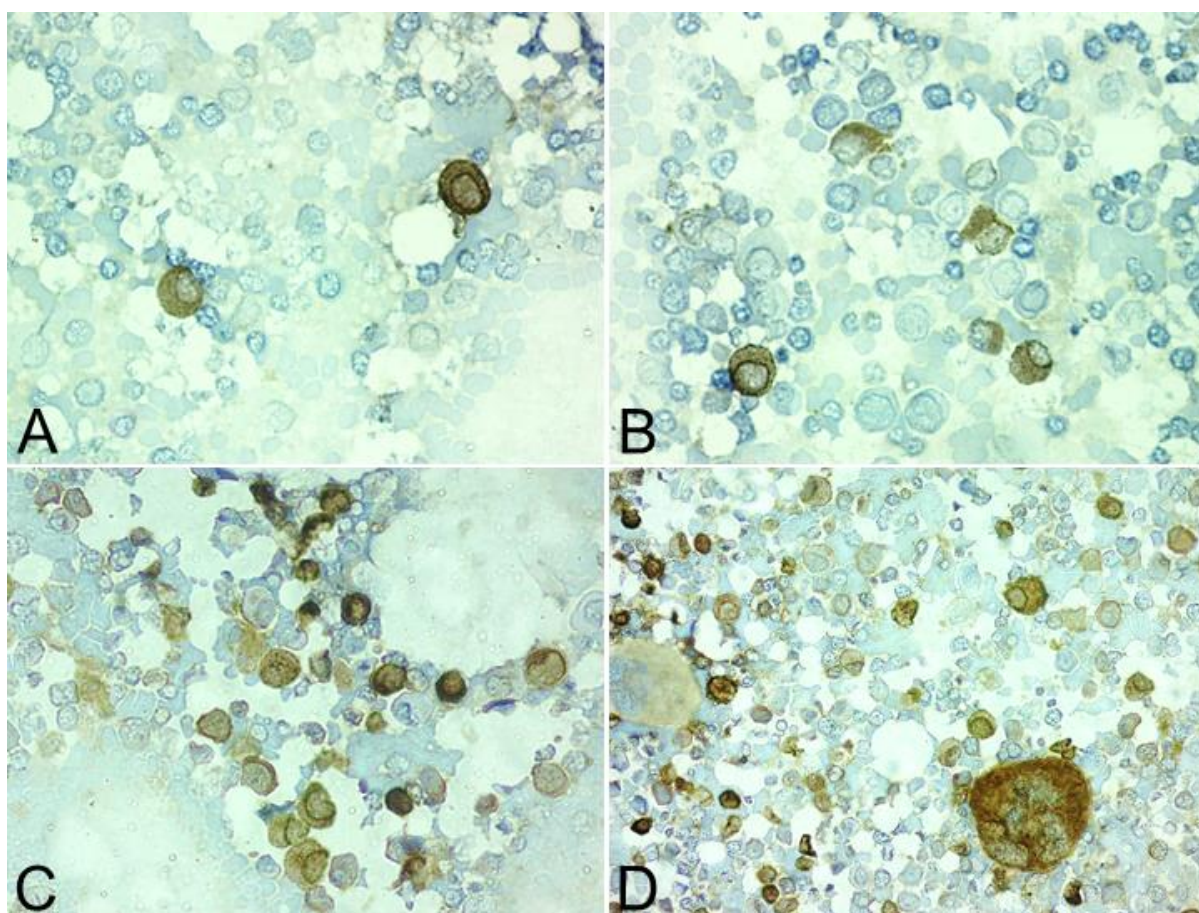
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Para FIV houve positividade em 4,3% (8/188) gatos, independente do teste utilizado. Destes animais, 3,2% (6/188) eram positivos somente na ICQ, 0,5% (1/188) somente no ELISA e 0,5% (1/188) em ambos os testes. Dos gatos positivos para FIV, 62,5% (5/8) eram machos e 37,5% (3/8) eram fêmeas, entre 5 e 48 meses de idade (\bar{x} 26,1; \pm 13,8), predominando animais jovens (50%; 4/8), seguidos por jovens adultos (37,5%; 3/8) e filhotes (12,5%; 1/8). A análise de concordância de Kappa Cohen entre ICQ e ELISA para FIV demonstrou concordância regular entre os testes ($k= 0,21$).

Quanto à intensidade de marcação ICQ para FeLV, observou-se marcação fraca em 52,9% (18/34) dos gatos (Figura 5A), moderada em 20,6% (7/34) (Figura 5B)

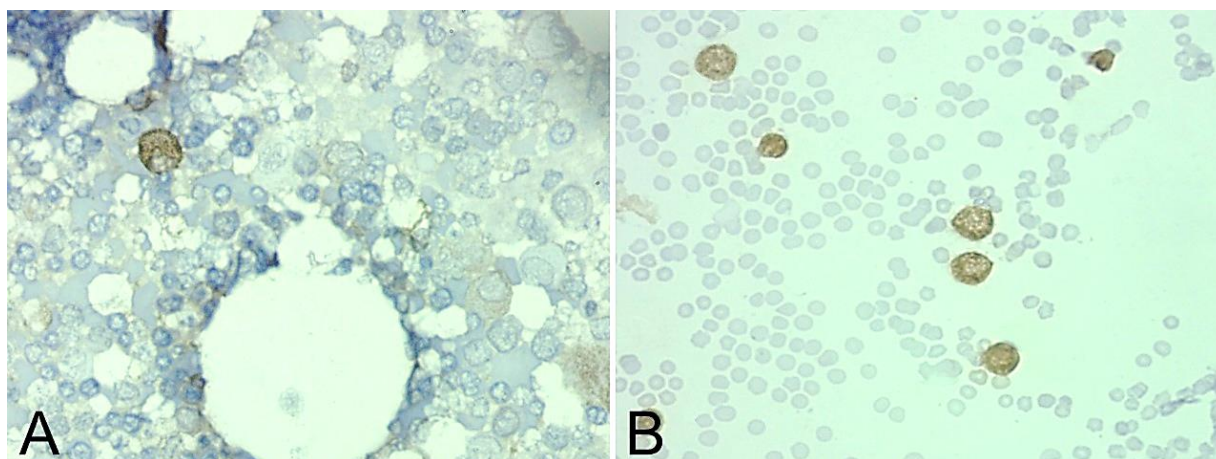
e acentuada em 26,5% (9/34) (Figura 5C e D). Das sete amostras de ICQ positivas para FIV, seis (85,7%) resultaram em marcação fraca (Figura 6A) e somente uma (14,3%) teve marcação moderada (Figura 6B). Ressalta-se que todos os animais positivos para FeLV ou FIV se apresentavam clinicamente saudáveis no momento da colheita das amostras de medula óssea.

Figura 5. Avaliação imunocitoquímica (ICQ) anti-FeLV (gp70) de medula óssea em gatos. A. Marcação intracitoplasmática fraca em precursores hematopoiéticos. B. Marcação moderada em cinco precursores hematopoiéticos. C. Marcação acentuada em múltiplos precursores hematopoiéticos. D. Marcação acentuada peri-espicular e intracitoplasmática em um megacariócito (seta) (Técnica do polímero ligado à peroxidase, DAB, x400).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 6. Avaliação imunocitoquímica (ICQ) anti-FIV (p24 gag) de medula óssea em gatos. A. Marcação intracitoplasmática em um único precursor hematopoiético com marcação intracitoplasmática. B. Marcação moderada em seis precursores hematopoiéticos (Técnica do polímero ligado a peroxidase, DAB, x400).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.4 DISCUSSÃO

A imunocitoquímica anti-FelV apresentou concordância substancial tanto com a PCR, quanto com o ELISA, o que atesta sua capacidade de diagnosticar a infecção tanto na fase progressiva, quanto na fase regressiva, que é o principal intuito dos diferentes testes para FelV disponíveis (LITTLE et al., 2019; WESTMAN et al., 2019). Já os resultados obtidos na ICQ para FIV, tiveram concordância regular, em que a ICQ apresentou maior positividade que o ELISA. Esse resultado se apresenta como um prospecto positivo para a identificação da infecção pelo FIV, visto que variações geográficas do vírus e a produção de anticorpos podem implicar em testes falso-negativos na PCR e no ELISA, respectivamente (FRANKENFELD et al., 2019; LITTLE et al., 2019).

Dentre os gatos testados nesse estudo, observou-se que dos positivos para FelV pela PCR, considerado um dos métodos de maior eficiência diagnóstica (LITTLE et al., 2020), dois terços foram positivos também na ICQ. Esses resultados são reflexos diretos da metodologia de cada uma das técnicas utilizadas na confecção desta pesquisa; a nested-PCR buscou detectar o DNA proviral até mesmo em quantidades ínfimas, a partir do gene *gag* e do LTR do FelV (MIYAZAWA; JARRETT, 1997; BIEZUS et al., 2019b), mas não objetivava identificar moléculas da superfície do envelope viral, tal como a ICQ anti-FelV gp70.

Em estudos pregressos de sensibilidade e especificidade do teste de ELISA utilizado neste estudo para detecção do antígeno p27 do FeLV foram de 98,6% e 98,2% respectivamente, já para o anticorpo p24 do FIV, a sensibilidade foi de 93,5% e especificidade de 100% (HARTMANN et al., 2007), porém resultados falsos-negativos no ELISA para FeLV podem ocorrer, conforme observados neste trabalho.

Esses falso-negativos ocorrem principalmente em duas situações: infecção progressiva, em curso por períodos inferiores a 30 dias em que ainda não ocorreu viremia ou há viremia transitória; e infecções regressivas, em que a resposta imune foi suficiente para conter, mas não para eliminar o vírus do organismo, que fica integrado ao DNA do hospedeiro sem promover viremia, doença clínica ou transmitir o agente (LITTLE et al., 2020). Especula-se que os resultados de ELISA falso-negativos neste trabalho estão associados ao curso da infecção, majoritariamente regressivo e, portanto, sem apresentação de viremia.

Quando o FeLV se insere no genoma hospedeiro com auxílio das integrases virais e inicia sua replicação, ele passa a expressar as proteínas de superfície gp70 e p15E durante o empacotamento do genoma na membrana citoplasmática. Esse processo pode ou não incumbir na persistência dessas proteínas virais na superfície da célula (HARTMANN, 2012a; WILLETT; HOSIE, 2013). Portanto, acredita-se que nos gatos com baixa carga viral avaliados neste trabalho, que evoluíram para a fase regressiva da infecção, a quantidade dessas proteínas de superfície das células pode ser insuficiente para realização do diagnóstico a partir da ICQ, assinalando resultados falso-negativos como os observados nesse estudo.

Em um estudo realizado com gatos que apresentavam citopenia buscando identificar a carga de RNA viral de FeLV em diferentes órgãos hematopoiéticos, foi possível observar que o baço foi o órgão com maior predomínio de partículas virais, seguido pelo sangue e só então pela medula óssea (ABDOLLAHI-PIRBAZARI et al., 2019). Tal fato demonstra que a realização de um estudo similar em gatos clinicamente saudáveis seria importante para determinar se há seletividade de sítios específicos de órgãos hematopoiéticos para o estabelecimento viral. Portanto, também não é possível descartar completamente que, apesar da amostra de medula óssea selecionada não expressar positividade, uma amostra de outro sítio medular ou de outro órgão do sistema hematopoiético fosse positiva.

Já para o FIV, resultados falso-negativos no ELISA podem ocorrer em gatos testados antes dos 60 dias pós-infecção, momento no qual a produção de anticorpos

ainda é limitada (LEVY; CRAWFORD; SLATER, 2004; LEVY et al., 2008). Na década de 90 se acreditava que resultados falso-negativos tendiam a ser pouco comuns, visto que, uma vez infectado pelo vírus e produzindo anticorpos o paciente expressaria positividade para os anticorpos por toda a vida (BARR, 1996).

Portanto, acredita-se que o maior número de animais detectados pela ICQ, mas negativos pelo ELISA, estavam em estágios iniciais da infecção, ainda não produzindo anticorpos em quantidades suficientes para expressar positividade no teste rápido. Essa constatação também foi verificada em um estudo que realizou hibridização *in situ* buscando RNA viral de FIV em cortes histológicos da medula óssea de gatos infectados, nos quais a identificação de partículas virais ocorreu em animais 59 e 63 dias pós-infecção, respectivamente (BEEBE et al., 1992), período em que se estima que alguns animais podem estar iniciando a produção de anticorpos.

Estudos recentes também demonstram que mutações no gene *env* induzidas por ação viral podem ser indutoras de resultados falso-negativos. Esse gene é responsável por codificar a proteína transmembrana (TM) do envelope viral, o principal epítipo indutor da produção de anticorpos anti-FIV (AVRAMEAS et al., 1992), portanto, mutações podem decorrer em alterações estruturais nessa molécula, conduzindo o organismo hospedeiro a produzir anticorpos irreconhecíveis por testes convencionais (CALZOLARI et al., 1995; FRANKENFELD et al., 2019).

Resultados falso-negativos na ICQ anti-FIV podem ser atribuídos ao decréscimo gradual da carga viral no organismo, o que ocorre comumente nas fases crônicas da infecção (SELLON; HARTMANN, 2012; FRANKENFELD et al., 2019; LITTLE et al., 2020). Como consequência dessa redução de carga, também ocorre redução no número de células infectadas passíveis de marcação. Esse fator também esclarece o motivo pelo qual a imunomarcação anti-FIV foi mais discreta em relação aos casos de positivos de ICQ anti-FelV. Apesar de não ter sido realizada PCR para os casos de FIV neste trabalho, a baixa carga viral também pode ser atribuída a resultados falsos-negativos nesta técnica (LITTLE et al., 2020).

Gatos podem ter resultados falso-positivos para FelV e FIV pela técnica da PCR, porém, esses erros estão atribuídos principalmente à falha operacional, devido a contaminação das amostras por material genético viral durante a execução do teste (WESTMAN; MALIK; NORRIS, 2019). A padronização, os controles positivos e negativos confiáveis e os protocolos rigorosos utilizados durante a realização da nested-PCR neste trabalho permite excluir a possibilidade da ocorrência de testes

falsos-positivos. Já para o teste de ELISA, a ocorrência de falsos-positivos para FeLV tem alta associação com alterações colorimétricas da amostra, como a hemólise (HOFMANN-LEHMANN; HARTMANN, 2020), um dos motivos pelo qual preconizou-se o uso de soro nesta pesquisa.

Malgrado a ICQ ser uma técnica frequentemente utilizada para o diagnóstico de inúmeras alterações neoproliferativas e degenerativas em diversas espécies (OSAMURA, 1989; PATARAPADUNGKIT et al., 2020; SONG et al., 2020; SANTANGELO et al., 2021), não havia, até então, sido descrita para o diagnóstico de FeLV ou FIV. Para identificação de retroviroses em outras espécies há descrição do uso da ICQ em ovinos para determinar se os adenocarcinomas pulmonares eram induzidos pelo vírus *Jaagsiekte* tipo 2 (TOMA et al., 2020); e em aves, para diagnóstico do vírus do sarcoma de Rous (STOKER; BISSELL, 1987). Porém, nenhum com objetivo de caracterizar a técnica como método de diagnóstico, tampouco comparar os resultados obtidos com outras técnicas, como neste trabalho.

Curiosamente, múltiplos artigos científicos datados das décadas de 80 e 90, realizando pesquisas associadas às retroviroses em distintas espécies e afecções, tendiam a utilizar o termo ICQ como sinonímia para a IHQ (KEYDAR et al., 1984; BUDKA et al., 1987; SCHRENZEL et al., 1990). Entretanto, é importante ressaltar que, tal como a citopatologia e a histopatologia, essas técnicas apesar de correlatas têm métodos distintos de preparo e análise e podem ter diferentes objetivos.

O total de gatos positivos para FeLV identificados nesta pesquisa, independente da técnica utilizada, foi discretamente superior ao esperado quando considerada a prevalência de 22,26% previamente identificada na região de estudo, diferente dos gatos positivos para FIV, em que ocorreu o inverso (BIEZUS et al., 2019b). É importante destacar que quando comparado somente o método de ELISA, utilizado como diagnóstico para determinar a prevalência no estudo supracitado, esse número reduz para a metade.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam a ocorrência elevada de gatos FeLV positivo, em comparação à baixa de FIV positivos. Esses resultados são amplamente contrastantes quando comparados aos obtidos em outras regiões do mundo aquém à América do Sul, onde a prevalência para FeLV varia de 1 a 15,6% (ARJONA et al., 2000; YILMAZ; ILGAZ; HARBOUR, 2000; GLEICH; KRIEGER; HARTMANN, 2009; ENGLERT et al., 2012; GATES; VIGEANT; DALE, 2017; STAVISKY; DEAN; MOLLOY, 2017), e de FIV entre 2,5 a 22,3% (YILMAZ; ILGAZ;

HARBOUR, 2000; GLEICH; KRIEGER; HARTMANN, 2009; ORTEGA-PACHECO et al., 2014; GATES; VIGEANT; DALE, 2017).

A ocorrência das retrovíroses felinas no Brasil diverge amplamente devido à extensa área territorial e também pela localização da região de estudo que pode divergir quanto ao número de gatos, cultura e questões socioeconômicas, variando de 0,33% a 33% para FeLV e 2,3% a 11,7% para FIV (HAGIWARA et al., 1997; VICENTE SOBRINHO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; COSTA et al., 2017; LACERDA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019b; ALMEIDA et al., 2021), corroborando com os dados obtidos no presente trabalho.

Mesmo com o número total de gatos machos avaliados sendo ligeiramente inferior ao de fêmeas, eles demonstraram proporcionalmente maior positividade tanto para FeLV quanto para FIV, o que já foi observado previamente em outros estudos (YILMAZ et al., 2000; GOLDKAMP et al., 2008; BIEZUS et al., 2019b), fato que está relacionado com o comportamento mais proeminente de cortejo e territorialismo dos machos, em comparação às fêmeas, o que torna confrontos entre eles importantes fatores favorecedores à infecção.

Estudos pregressos indicam que a faixa etária de animais infectados por FeLV varia entre jovens e jovens adultos (LEVY; EDINBORO, 2006; ALMEIDA et al., 2012; GATES; VIGEANT; DALE, 2017; BIEZUS et al., 2019b), tal como observado neste trabalho, em que prevaleceram os animais jovens. Mesmo com a baixa ocorrência de animais FIV positivos neste estudo, notou-se semelhança ao observado para FeLV no tocante às faixas etárias, conflitando diretamente com dados da literatura, que apontam a ocorrência de FIV em animais mais velhos (GLEICH; KRIEGER; HARTMANN, 2009; RAVI et al., 2010; BIEZUS et al., 2019b; SZILASI et al., 2019).

O contato intraespécie nos animais positivos para FeLV e FIV nesta pesquisa se revelou altamente presente, seja pela permissibilidade dos tutores para que os gatos acessassem a rua ou então pelo compartilhamento do mesmo ambiente, comedouros e bebedouros entre vários animais, sejam eles de responsabilidade do mesmo tutor, ou errantes, algo já descrito como fator associado à infecção retroviral previamente a partir de modelos epidemiológicos (FROMONT; PONTIER; LANGLAIS, 1998), e também do cotidiano (BANDECCHI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2012; BANDE et al., 2012; CHHETRI et al., 2015; BIEZUS et al., 2019b).

Neste trabalho a técnica de ICQ foi aplicada unicamente em amostras de medula óssea, porém, não se descarta que a ICQ anti-FeLV e FIV possa ser realizada

em leucócitos obtidos a partir da capa leucocitária ou até mesmo de citoaspirados de neoplasias extra e intracavitárias e tenha resultados satisfatórios na detecção da infecção retroviral. Não há documentação da aplicação desta técnica em gatos, entretanto, relata-se o uso da ICQ para identificação do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em leucócitos obtidos da capa leucocitária, demonstrando resultados similares aos do isolamento viral e da PCR em tempo real (ÖZKUL et al., 2002).

Inúmeros trabalhos descrevem a eficiência de testes de ELISA e PCR para o diagnóstico de FeLV e FIV em gatos com diferentes técnicas e amostras (ARJONA et al., 2007; MAZUR et al., 2010; LIU et al., 2016; LEVY et al., 2017; WESTMAN et al., 2017), porém, até o momento não existia nenhum trabalho publicado que descrevesse a utilização e apontasse a eficiência da ICQ para o diagnóstico de FeLV e FIV.

4.5 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos nesta pesquisa foi constatada que a capacidade de detectar a infecção por FeLV tanto na fase progressiva, quanto na regressiva, como a PCR, e por ter demonstrado ser tão eficiente quanto o ELISA para o diagnóstico de FIV, tornam a ICQ uma ferramenta diagnóstica a ser considerada para uso na rotina diagnóstica. Quando comparada com as técnicas comumente utilizadas na identificação do FeLV, obteve concordância substancial, provando-se capaz de detectar animais na fase progressiva e regressiva da infecção, tal como o PCR, considerado eficiente. A detecção de infecção por FIV nos pacientes desse estudo por ELISA foi menor se comparado com a ICQ. Conclui-se, portanto, que a ICQ é eficiente e funcional para o diagnóstico de FeLV e FIV, podendo ser utilizada como uma ferramenta para identificação do *status* infectivo em gatos.

4.6 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-PIRBAZARI, M.; JAMSHIDI, S., NASSIRI, S. M., ZAMANI-AHMADMAHMUDI, M. Comparative measurement of FeLV load in hemolymphatic tissues of cats with hematologic cytopenias. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2019.
- ALMEIDA, N. R. De; DANELLI, M. G. M. M.; DA SILVA, L. H. P. P.; HAGIWARA, M. K.; MAZUR, C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 8, p. 583–586, 2012.
- ALMEIDA, I. O.; SILVA, M. A. A.; SENA, B. V.; PAZ, J. S.; JARETTA, T. A.; FARIA, P. C. G.; HORTA, R. S. Estudo retrospectivo de retrovírus por teste imunoenzimático em gatos na Grande Vitória (ES, Brasil) e neoplasias associadas. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e114220-e114220, 2021.
- ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOMÉNECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V. M.; TOURAL, C.; MARTÍN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 1, p. 14–22, 2007.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. 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.
- AVRAMEAS, A.; GUILLET, J. G.; CHOUCANE, L.; MORAILLON, A.; SONIGO, P.; STROSBURG, A. D. Localization of three epitopes of the ENV protein of feline immunodeficiency virus. **Molecular Immunology**, v. 29, n. 5, p. 565–572, 1992.
- BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; SAPIAN, N. A.; RAHMAN, N. A.; ALAZAWY, A. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.
- BANDECCHI, P.; DELL'OMODARME, M.; MAGI, M.; PALAMIDESSI, A.; PRATI, M. C. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. **Veterinary Record**, v. 158, n. 16, p. 555–557, 2006.
- BARR, M. FIV, FeLV and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, p. 144–153, 1996.

BEALL, M. J.; BUCH, J.; CAHILL, R. J.; CLARK, G.; HANSCOM, J.; ESTRADA, M.; LEUTENEGGER, C. M.; CHANDRASHEKAR, R. Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 67, August, p. 101348, 2019.

BEEBE, A. M.; GLUCKSTERN, T. G.; GEORGE, J.; PEDERSEN, N. C.; DANDEKAR, S. Detection of feline immunodeficiency virus infection in bone marrow of cats. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 37-49, 1992.

BIEZUS, G.; FERIAN, P. E.; PEREIRA, L. H. H. da S.; WITHOEFT, J. A.; ANTUNES, M. M.; XAVIER, M. G. N.; VOLPATO, J.; CRISTO, T. G. De; FONTEQUE, J. H.; CASAGRANDE, R. A. Clinical and Haematological Disorders in Cats with Natural and Progressive Infection by Feline Leukemia Virus (FeLV). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 0, p. 1–9, 2019. a.

BIEZUS, G.; MACHADO, G.; FERIAN, P. E.; COSTA, U. M. Da; PEREIRA, L. H. H. da S.; WITHOEFT, J. A.; NUNES, I. A. C.; MULLER, T. R.; CRISTO, T. G. De; CASAGRANDE, R. A. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, June, p. 17–21, 2019. b.

BUDKA, H.; COSTANZI, G.; CRISTINA, S.; LECHI, A.; PARRAVICINI, C.; TRABATTONI, R.; VAGO, L. Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV) - A histological, immunocytochemical, and electron microscopical study of 100 autopsy cases. **Acta Neuropathologica**, v. 75, n. 2, p. 185–198, 1987.

BURLING, A. N.; LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; CRANDALL, M. M.; TUCKER, S. J.; WOOD, E. G.; FOSTER, J. D. Seroprevalences of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus Infection in Cats in the United States and Canada and Risk Factors for Seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 2, p. 187–194, 2017.

CALZOLARI, M.; YOUNG, E.; COX, D.; DAVIS, D.; LUTZ, H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1–2, p. 83–92, 1995.

CHHETRI, B. K.; BERKE, O.; PEARL, D. L.; BIENZLE, D. Comparison of risk factors for seropositivity to feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats: A case-case study. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.

CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F.; PEREIRA, L. H. H. S. H. S.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 20–28, 2019. a.

CRISTO, T. G. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F. F.; GASPAR, T.; DAL PONT, T. P. P.; WITHOEFT, J. A. A.; FURLAN, L. V. V.; COSTA, L. S. S.; TRAVERSO, S. D. D.; CASAGRANDE, R. A. A. Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 170, p. 10–21, 2019. b.

DAY, M. J.; CRAWFORD, C.; MARCONDES, M.; MURDOCH, U. De; PAULISTA, U. E.; COOK, U. J.; EXECUTIVO, R. Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: um relatório do Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, p. 1–39, 2020.

ENGLERT, T.; LUTZ, H.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 392–398, 2012.

FRANKENFELD, J.; MEILI, T.; MELI, M. L.; RIOND, B.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K.; BÖNZLI, E.; PINEROLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R. Decreased sensitivity of the serological detection of feline immunodeficiency virus infection potentially due to imported genetic variants. **Viruses**, v. 11, n. 8, 2019.

FROMONT, E.; PONTIER, D.; LANGLAIS, M. Dynamics of a feline retrovirus (FeLV) in host populations with variable spatial structure. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1401, p. 1097–1104, 1998.

GAGNON, A. C.; LANGLADE, C.; BUFF, S.; ROSSET, E. A retrospective internet-based survey of French cat breeders about early-age neutering. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 6, p. 514-520, 2020.

GATES, M. C.; VIGEANT, S.; DALE, A. Prevalence and risk factors for cats testing positive for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in cats entering an animal shelter in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, n. 6, p. 285–291, 2017.

GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 12, p. 985–992, 2009.

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

HAGIWARA, M. K.; RECHE Jr., A.; LUCAS, S. R. R. Clinical studies of feline leukemia virus infection among cats in São Paulo, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 4, p. 35–38, 1997.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. a. p. 108–136.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684–2710, 2012. b.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C. E.; VIDYASHANKAR, A. N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H. F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 6, p. 439–445, 2007.

HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, n. 5, p. 1013–1036, 2020.

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

HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J. B.; GRUBER S; BORETTI, F.; SIGRIST, B.; LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 7, p. 1589–1596, 2001.

JACKSON, M. L.; HAINES, D. M.; TAYLOR, S. M.; MISRA, V. Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 1996. a.

JACKSON, M. L.; WOOD, S. L.; MISRA, V.; HAINES, D. M. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: Relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 3, p. 199–204, 1996. b.

KEYDAR, I.; OHNO, T.; NAYAK, R.; SWEET, R.; SIMONI, F.; WEISS, F.; KARBY, S.; MESA-TEJADA, R.; SPIEGELMAN, S. Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: Immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13 I, p. 4188–4192, 1984.

LACERDA, L. C.; SILVA, A. N.; FREITAS, J. S.; CRUZ, R. D. S.; SAID, R. A.; MUNHOZ, A. D. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2017.

LEITE-FILHO, R. V.; PANZIERA, W.; BANDINELLI, M. B.; HENKER, L. C.; DA CONCEIÇÃO MONTEIRO, K.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P. Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. **Veterinary and Comparative Oncology**, April, p. 1–7, 2019.

LEONARDO, E.; BARDALES, R. H. H. **Practical immunocytochemistry in diagnostic cytology**. 1. ed. Cham, Suíça: Springer Nature Switzerland, 2020.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E.; THAYER, V.; LEVY, J.; CRAWFORD, C.; THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 3, p. 300–316, 2008.

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 10, p. 1558–1561, 2004.

LEVY, J. K.; EDINBORO, C. H. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, feline leukemia virus, and feline immunodeficiency virus infection among dogs and cats exported from the 2005 Gulf Coast hurricane disaster area. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 3, p. 371–376, 2006.

LEVY, L. S. Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 14–22, 2008.

LITTLE, S.; LEVY, J.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOSIE, M.; OLAH, G.; DENIS, K. S. 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 1, p. 5–30, 2020.

LIU, J.; O'CONNOR, T.; BEALL, M.; CHANDRASHEKAR, R.; LAPPIN, M. Evaluation of rapid diagnostic test kits for feline leukemia virus infection using samples from naturally infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 2, n. 2, p. 1–4, 2016.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287–296, 2004.

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

MÖSTL, K.; ADDIE, D. D.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Something old, something new: Update of the 2009 and 2013 ABCD guidelines on prevention and management of feline infectious diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 7, p. 570–582, 2015.

OBERT, L. A.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus clade C mucosal transmission and disease courses. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, n. 7, p. 677–688, 2000.

ORTEGA-PACHECO, A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; COLIN-FLORES, R. F.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; GUZMAN-MARIN, E.; JIMENEZ-COELLO, M. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 460–464, 2014.

ORTEGA, C.; VALENCIA, A. C.; DUQUE-VALENCIA, J.; RUIZ-SAENZ, J. Prevalence and genomic diversity of feline leukemia virus in privately owned and shelter cats in Aburrá Valley, Colombia. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2020.

OSAMURA, R. Y. Applications of immunocytochemistry to diagnostic cytopathology. **Diagnostic Cytopathology**, v. 5, n. 1, p. 55–63, 1989.

ÖZKUL, AYKUT; YEŞİLBAĞ, KADİR; BURGU, İBRAHİM. Comparison of four diagnostic techniques for detecting bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in buffy coat samples after long-term storage. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 26, n. 5, p. 1043-1048, 2002.

PATARAPADUNGKIT, N.; KHONHAN, P.; PISUTTIMARN, P.; PIENTONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; KOONMEE, S. Human papillomavirus detection and abnormal anal cytology in HIV-infected patients using p16/Ki-67 dual-staining. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 7, p. 2013–2019, 2020.

PENA, H. F. de J.; EVANGELISTA, C. M.; CASAGRANDE, R. A.; BIEZUS, G.; WISSER, C. S.; FERIAN, P. E.; MOURA, A. B. De; ROLIM, V. M.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B. F.; GENNARI, S. M.; TRAVERSO, S. D. Fatal toxoplasmosis in an immunosuppressed domestic cat from Brazil caused by *Toxoplasma gondii* clonal type I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 2, p. 177–184, 2017.

RAVI, M.; WOBESER, G. A.; TAYLOR, S. M.; JACKSON, M. L. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and survival analysis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 271–276, 2010.

ROBBINS, H. J.; CASEY, R. A.; CLEMENTS, J.; GRUFFYDD-JONES, T.; MURRAY, J. K. Assessing the impact of a regional UK feline neutering campaign. **Veterinary Record**, v. 182, n. 10, p. 291-291, 2018.

SANTANGELO, K. S.; SCHAEFER, D. M. W.; LEAVELL, S. E.; PRIEST, H. L. Special Staining Techniques: Application and Quality Assurance. In: SHARKEY, L. C.; RADIN, M. J.; SEELI, D. **Veterinary Cytology**. 1th. ed. Hoboken, Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2021. p. 47–72.

SCHRENZEL, M. D.; HIGGINS, R. J.; HINRICHS, S. H.; SMITH, M. O.; TORTEN, M. Type C retroviral expression in spontaneous feline olfactory neuroblastomas. **Acta Neuropathologica**, v. 80, n. 5, p. 547–553, 1990.

SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 136–149.

SONG, S. G.; LEE, J.; KOH, J.; KIM, S.; CHUNG, D. H.; JEON, Y. K. Utility of PD-L1 immunocytochemistry using body-fluid cell blocks in patients with non-small-cell lung cancer. **Diagnostic Cytopathology**, v. 48, n. 4, p. 291–299, 2020.

STAVISKY, J.; DEAN, R. S.; MOLLOY, M. H. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011-2012). **The Veterinary Record**, v. 181, n. 17, p. 451, 2017.

STOKER, A. W.; BISSELL, M. J. Quantitative immunocytochemical assay for infectious avian retroviruses. **Journal of General Virology**, v. 68, n. 1987, p. 2481–2485, 1987.

SUNTZ, M.; FAILING, K.; HECHT, W.; SCHWARTZ, D.; REINACHER, M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 1–2, p. 71–80, 2010.

SYKES, J. E. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: J. E. Sykes (Ed.). **Canine and feline infectious diseases**. 1. Ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2014. p. 214–221.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: Jane E Sykes (Eds.). **Canine and feline infectious diseases**. 1. Ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2014. p.222–235.

SZILASI, A.; DÉNES, L.; KRIKÓ, E.; HEENEMANN, K.; ERTL, R.; MÁNDOKI, M.; VAHLENKAMP, T. W.; BALKÁ, G. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 5, n. 2, p. 205511691989209, 2019.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004.

TOMA, C.; BÂLTEANU, V. A.; TRIPON, S.; TRIFA, A.; REMA, A.; AMORIM, I.; POP, R. M.; POPA, R.; CATOI, C.; TAULESCU, M. Exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus type 2 (exJSRV2) related to ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) in Romania: prevalence, anatomical forms, pathological description, immunophenotyping and virus identification. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 296, 2020.

VOGT, A. H.; RODAN, I.; BROWN, M.; BROWN, S.; FORMAN, M. J. L.; NEILSON, J.; SPARKES, A. AAHP – AAHA Feline Life Stage Guidelines Background and Goals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, p. 70–85, 2010.

WEISS, A. FeLV-associated chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 12, p. 995–996, 2010.

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

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 16–23, 2013.

WITHOEFT, J. A.; CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; COSTA, L. S.; PONT, T. P. D.; FREITAS, A. C.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Causes of death and euthanasia in domestic cats in the Santa Catarina plateau (1995-2015). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 192–200, 2019.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of FIV and FELV Infections in Cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, n. 1, p. 69–70, 2000

5 CARACTERIZAÇÃO DE ASPIRADOS DE MEDULA ÓSSEA DE GATOS SEM ALTERAÇÕES CLÍNICAS E COM DIFERENTES CONDIÇÕES HEMATOLÓGICAS

RESUMO

A avaliação da medula óssea possui grande importância para o diagnóstico de inúmeras alterações hematológicas em animais, principalmente em gatos. Nessa espécie há maior propensão ao desenvolvimento de alterações hematopoiéticas que por sua vez estão comumente associadas à infecção pelos vírus da leucemia (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV). Este estudo objetiva demonstrar as principais características da medula óssea de gatos clinicamente saudáveis de acordo com suas alterações hematológicas. Para tal, foram colhidas e avaliadas amostras de sangue total e medula óssea de 188 gatos, dos quais foram selecionados 120 gatos clinicamente saudáveis, negativos para FeLV e FIV, e cujas amostras de medula óssea se encontravam em perfeita qualidade para análise. Os gatos foram separados em grupos de acordo com as alterações hematológicas e, a partir disso, os dados obtidos na avaliação da medula óssea foram compilados em tabelas de contingência para análise descritiva. Dos 120 gatos, 64,2% eram fêmeas e 35,8% machos, destes predominaram jovens (67,5%). A média de espículas medulares nessas amostras foi de 13,7% e a densidade de 44%. Na avaliação quantitativa da medula, os prorrubríctos e os rubriblastos se apresentaram em quantidades superiores do preconizado em todos os gatos com ou sem alterações hematológicas. Em todos os grupos os linfócitos estavam diminuídos, e os gatos que apresentavam linfocitose foram os mais próximos do intervalo de referência, apresentando *flame cells* e células de Mott. A avaliação quantitativa da medula óssea mostrou valores distintos do preconizado, inclusive em gatos sem alterações hematológicas. Existe a necessidade de avaliar a medula óssea de forma global, não se atendo somente aos números que podem determinar erroneamente um diagnóstico.

Palavras-chave: Eritropoiese, leucopoiese, mielograma, hematologia.

CHARACTERIZATION OF BONE MARROW ASPIRATES FROM CATS WITHOUT CLINICAL CHANGES AND WITH DIFFERENT HEMATOLOGICAL CONDITIONS

ABSTRACT

Bone marrow evaluation had great importance for the diagnosis of numerous hematological alterations in animals, especially in cats. In this species, there is a greater propensity for the development of hematopoietic alterations, which in turn are commonly associated with infection by the leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency (FIV). This study aims to demonstrate the main characteristics of the bone marrow of clinically healthy cats according to their hematological alterations. For this purpose, samples of whole blood and bone marrow from 188 cats were collected and evaluated, from which 120 clinically healthy cats, negative for FeLV and FIV, and whose bone marrow samples were in perfect quality for analysis, were selected. The animals were separated into groups according to hematological alterations and, from this, the data obtained in the bone marrow evaluation were compiled in contingency tables for descriptive analysis. Of the 120 cats, 64.2% were female and 35.8% male, predominantly young (67.5%). The average of medullary spicules in these samples was 13.7% and the density was 44%. In the quantitative evaluation of the marrow, prorubrocytes and rubriblasts were in higher quantities than recommended in all animals with or without hematological alterations. In all groups, lymphocytes were reduced, and cats with lymphocytosis were closest to the reference range, showing flame and Mott cells. Quantitative bone marrow evaluation showed values different from those recommended, including in cats without hematological alterations. There is a need to assess the bone marrow globally, not just paying attention to numbers that can erroneously determine a diagnosis.

Keywords: Erythropoiesis, leucopoiesis, myelogram, hematology.

5.1 INTRODUÇÃO

A avaliação da medula óssea é um recurso valioso para a identificação de enfermidades associadas à produção, maturação e liberação de eritrócitos, leucócitos e megacariócitos, e permite identificar alterações nestas células diretamente no seu sítio de origem (HARVEY, 2012a; STACY; HARVEY, 2017). Na medicina veterinária, apesar de ainda negligenciada pela comunidade clínica, a aspiração de medula óssea é mais utilizada do que a biópsia medular devido a maior velocidade e facilidade de obtenção da amostra (HARVEY, 2012a; RASKIN; MESSICK, 2012). Biópsias medulares tem maior vantagem na avaliação da estrutura e na celularidade global da medula óssea, entretanto, a avaliação da morfologia das células é limitada e complexa, o que torna a aspiração o exame de eleição para este fim (HARVEY, 2012a; MYLONAKIS; HATZIS, 2014; STACY; HARVEY, 2017).

O exame de medula óssea deve ser feito em conjunto com a avaliação hematológica e consiste em duas análises principais, a citológica e a numérica (RASKIN; MESSICK, 2012; MYLONAKIS; HATZIS, 2014; STACY; HARVEY, 2017). A primeira busca caracterizar a morfologia das células, aponta alterações citoplasmáticas e nucleares, já a segunda intenta uma visão mais ampla da composição medular, indica a variação numérica das células precursoras e suas linhagens subsequentes. Ambas são complementares e nenhuma das partes deve ser ignorada à avaliação do patologista (STACY; HARVEY, 2017).

Para a medicina felina, a avaliação da medula óssea é indicada em pacientes com histórico de anemia arregenerativa, neutropenia e trombocitopenia persistentes, leucocitose sem causa definida, anomalias morfológicas nos leucócitos, eritrócitos e plaquetas circulantes (JAIN, 1993a, 1993b; WEISS, 2006; WEISS; WARDROP, 2010; HARVEY, 2012b; BYERS, 2017; TURINELLI; GAVAZZA, 2018). Além disso, é de grande valor diagnóstico quando existem suspeitas de disfunções medulares decorrentes de neoplasias, primárias ou metastáticas, ou associadas com a infecção pelos vírus da leucemia felina (FeLV) e imunodeficiência felina (FIV) (WEISS; WARDROP, 2010; HARVEY, 2012b; BYERS, 2017; TURINELLI; GAVAZZA, 2018;).

Apesar da grande importância da avaliação medular nesta espécie, os valores de referências datam das décadas de 1960 e 1990 e consideraram resultados obtidos em um pequeno número de animais, o que permite uma variação muito estreita dos valores para a espécie (GILMORE; GILMORE; JONES, 1964; JAIN, 1993a; STACY;

HARVEY, 2017). Além disso, existe uma coleção relativamente pequena de trabalhos que estudam a medula óssea de gatos de forma quantitativa, e comumente esses estudos se direcionam a alterações específicas, como as doenças associadas com infecções e neoplasias (TOTH; ONIONS; JARRETT, 1986; JAIN, 1993b; BREUER et al., 1998; WEISS, 2006; HISASUE et al., 2009).

A partir disto, este trabalho objetiva demonstrar as características citológicas e a contagem diferencial de amostras de medula óssea obtidas em um pequeno espaço de tempo em uma população de gatos sem alterações clínicas evidentes, de acordo com as alterações hematológicas expressadas por eles.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Composição do estudo

Amostras de sangue e medula óssea foram colhidas de 188 gatos selecionados de forma randômica na rotina de atendimentos e castração do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde e de atendimentos clínicos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), ambos no município de Lages/SC, Brasil, entre os meses de abril a dezembro de 2019. Não houve restrição quanto ao gênero, idade e raça, e a participação dos animais no estudo foi dependente do consentimento e autorização do tutor (Apêndice A1-2).

A faixa etária dos animais foi determinada de acordo com as diretrizes de estágios de vida para animais da espécie felina da *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) e a *American Animal Hospital Association* (AAHA) (VOGT et al., 2010) quanto a idade os gatos foram classificados em filhote (0 a 6 meses), jovem (7 meses a 2 anos), jovem adulto (3 a 6 anos), adulto (7 a 10 anos), adulto idoso (11 a 14 anos) e idoso (acima de 15 anos).

Gatos clinicamente debilitados, com dermatopatias ou históricos de doenças recentes evidenciadas clinicamente foram excluídos do estudo. Adicionalmente, todos os gatos foram testados para FeLV por PCR e para FeLV e FIV por ELISA do sangue periférico e ICQ de aspirados de medula óssea, e os positivos foram excluídos do estudo, tal como os animais nos quais foi constatada infecção por *Mycoplasma* spp.

durante avaliação microscópica dos esfregaços sanguíneos. Dos 188 gatos avaliados, 49 foram positivos para FeLV e dois foram positivos mutuamente para FeLV e FIV em ao menos um dos testes diagnósticos utilizados e foram excluídos deste estudo.

A testagem para FeLV e FIV foi realizada pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA; SNAP® FIV/FeLV *Combo Test*, IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, EUA) e adicionalmente para FeLV pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir da técnica de nested-PCR adaptada de Miyazawa e Jarret (1997). O DNA proviral do FeLV foi amplificado com base na região U3 LTR e o gene *gag* de um FeLV do subgrupo A.

5.2.2 Hemograma

A colheita de sangue para hemograma foi realizada a partir de venopunção jugular e a amostra foi acondicionada em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e prontamente levadas para análise no Laboratório Clínico Veterinário (LCV) do CAV/UDESC. Para determinação do hematócrito utilizou-se o método de microhematócrito em centrífuga (MicroSpin, Jaboticabal, São Paulo, Brasil). A contagem total de eritrócitos e leucócitos foi realizada com contador automático de células (SDH-3 Vet, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Para determinar o diferencial de leucócitos e a quantidade de plaquetas estimadas, realizou-se extensão sanguínea preparadas com corante hematológico rápido (NewProv, Pinhais, Paraná, Brasil). Para avaliação e interpretação das alterações em hemograma foram utilizados os valores de referência estabelecidos previamente por Weiss e Wardrop (2010).

5.2.3 Colheita e análise da medula óssea

Para colheita de medula óssea os gatos foram mantidos em anestesia geral dissociativa com cetamina e xilazina por via intramuscular (IM) nas doses de 10 mg/kg e 1,5 mg/kg, respectivamente. Como medicação pré-anestésica foi utilizado tramadol (2 mg/kg IM) e antibioticoterapia preventiva com penicilina benzatina (24 mg/kg IM). O acompanhamento pós-colheita do paciente era realizado pela equipe clínica durante as primeiras seis horas.

Para acesso ao canal medular foi realizado o posicionamento dos pacientes em decúbito lateral direito e inspeção da face cranial do ombro para identificação da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo e preparo cirúrgico do local com tricotomia e antissepsia com digliconato de clorexidina a 2% e álcool 70%. Realizava-se uma pequena incisão cutânea com lâmina de bisturi número 24 para inserção da cânula ergonômica, padrões Jamshidi trifacetada e Illinois em bisel (Figura 7) com sistema de fechamento *Luer-Lock* em tamanhos 16G (0BIL1617/080® e BIL1617®, Biomedical Srl, Firenze, Itália), para animais com peso inferior a 1,599 kg, e 13G (0BLT 1310® e BIL1310®, Biomedical Srl, Firenze, Itália), com peso superior a 1,6 kg.

Após a inserção, as cânulas eram levemente pressionadas na cortical do úmero e rotacionadas bilateralmente em ângulo de 90° repetidas vezes, até penetrarem no canal medular. A estabilização da agulha era avaliada mediante a remoção mecânica do mandril, constatando a imobilidade da cânula no canal medular. Se estável, realizava-se a aspiração de medula óssea com auxílio de uma seringa de 10 mL em volumes variando de 0,3 a 0,8 mL.

Figura 7 - Técnica de colheita de amostra da medula óssea em gatos a partir da tuberosidade deltoide do úmero esquerdo utilizando cânulas no padrão Illinois 13G.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Foram confeccionadas no mínimo cinco e no máximo oito lâminas de medula óssea de cada animal, variando de acordo com a quantidade de espículas obtidas. Para o preparo das amostras foi utilizada a técnica de *squash* com as lâminas de vidro cruzadas, posteriormente coradas pela técnica de May Grunwald-Giemsa (MGG), consistindo em May Grunwald azul de metileno-eosina puro (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), por 3 minutos, e Azur-eosina-azul de metileno em solução segundo Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), diluído em tampão de Sörensen (30 gotas de corante em 1 mL de tampão), por 15 minutos.

As lâminas citológicas de medulas ósseas foram avaliadas primeiramente de acordo com o número de espículas medulares por lâmina (x100); densidade e celularidade das espículas (número de precursores vs. adipócitos); grau de maturação dos precursores e quantidade de linfócitos e plasmócitos a cada cinco campos de maior aumento (x400).

Para a avaliação quantitativa e interpretação dos esfregaços foram utilizados, para fins de comparação, os valores de referência previamente descritos por Jain (1993a) (Quadro 1). A avaliação citomorfológica foi realizada de acordo com o descrito por Harvey (2012b), para tanto foram avaliados criteriosamente megacariócitos em magnificação de x100 em 10 campos da região periespicular e espicular. A avaliação diferencial quantitativa da medula óssea foi realizada nas duas melhores lâminas de cada animal (as quais estavam livres de artefatos e sem sobreposição celular) a partir da contagem de 500 células nucleadas totais (CNT) em aumento de x1000 em imersão com auxílio de microscópio óptico, catalogadas e calculadas com auxílio do aplicativo para *smartphone* BM conter^{©2008} (Kazuyoshi Sasaoka, AppStore). A contagem diferencial das células foi feita em *hot spots* na periferia das espículas. Dentre todas as amostras colhidas, 17 possuíam CNT inferior a 500 ou apresentavam acentuada agregação plaquetária e, portanto, foram excluídas da análise.

Ademais, considerou-se a medula óssea em estado regular quando evidenciada celularidade variando entre 25% e 75%, em relação à quantidade de precursores vs. adipócitos, amplamente dependente da faixa etária do animal em questão, em que essa relação diminui proporcionalmente com o avanço da idade. Esses resultados foram sempre analisados conjuntamente com o eritrograma e o leucograma do respectivo paciente.

As células foram avaliadas minuciosamente quanto ao tamanho, grau de maturação, coloração de citoplasma, formato nuclear, segmentação de núcleo, arranjo

de cromatina, características de citoplasma e membrana citoplasmática, e as alterações foram descritas conforme preconizado por Harvey (2012). A série eritrocítica foi avaliada desde os estágios mais iniciais até os eritrócitos policromatófilos, atentando-se a células megaloblásticas, multinucleadas e com núcleos pleomórficos.

Como os plasmócitos apresentam ampla variabilidade morfológica, foi avaliada a quantidade de células e as características citoplasmáticas. Outras células como fagócitos, mastócitos, osteoclastos e fibroblastos também foram descritos de forma quantitativa quando existentes. Toda a avaliação medular foi completamente transcrita em uma ficha específica para este fim, que consta no Apêndice D.

Quadro 1 - Contagem diferencial de células da medula óssea de gatos (n= 7) predeterminada por Jain (1993a).

Tipo celular	Referência %	Tipo celular	Referência %
Mieloide		Eritroide	
Mieloblasto	0 – 0,4	Rubriblasto	0 – 0,8
Promielócito	0 – 3,0	Prorrubricito	0 – 1,6
Mielócito neutrofílico	4,4 – 13,2	Rubricito	10,2 – 29,4
Metamielócito neutrofílico	0,6 – 8,0	Metarrubricito	1,0 – 10,4
Neutrófilo bastonete	12,8 – 16,6	Outros	
Neutrófilo segmentado	6,8 – 22,0	Linfócitos	11,6 – 21,6
Mielócito eosinofílico	0,8 – 3,2 (soma da série eosinofílica)	Plasmócitos	0,2 – 1,6
Metamielócito eosinofílico		Monócitos	0 – 0,2
Eosinófilo bastonete		Macrófagos	0 – 0,2
Eosinófilo segmentado		Série tromboblástica, mastócitos, osteoclastos, fibroblastos, células estromais	Raros
Série basofílica	0 – 0,4		
Relação Mieloide/Eritroide (RME)		1,21 – 2,16	

Fonte: Adaptado de Jain (1993a).

5.2.4 Análise estatística

Os grupos de animais avaliados foram selecionados e separados de acordo com as alterações hematológicas encontradas ou inexistência, para fins de comparação com os dados obtidos na análise da medula óssea. Os dados obtidos foram compilados em planilhas no Software Excel® (2019) para análise estatística descritiva e inferencial, determinando médias, desvios padrões e valores máximos e mínimos, com auxílio do software estatístico Jamovi® versão 2.0 (Jamovi Project Computer Software, Sydney, Austrália).

5.2.5 Comitê de ética e experimentação animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UDESC, com o número de registro 2306130319 (ID 000831) (Apêndice C).

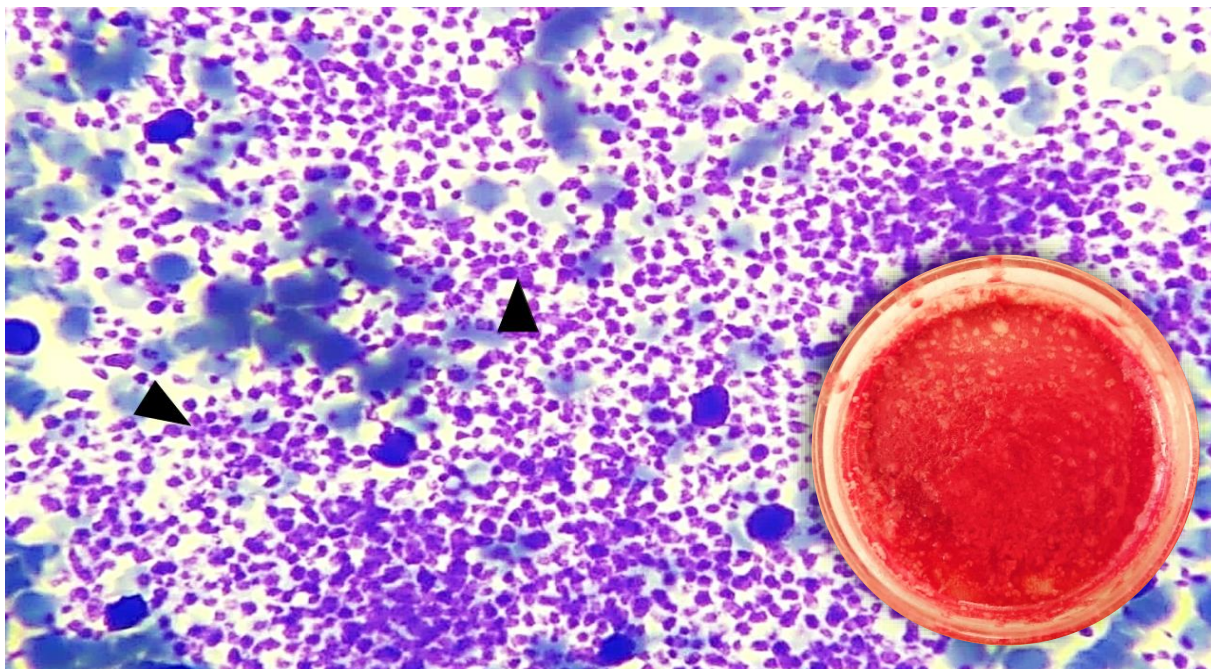
5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação geral

O número total de animais inclusos nesta pesquisa foi 120, após a exclusão dos gatos positivos para FeLV ou FIV, ou então dos que apresentaram amostras de medula óssea com contaminação abundante com sangue periférico, repletas por agregados plaquetários e feixes de fibrina (Figura 8). Ademais, treze amostras apresentaram hemodiluição (Figura 9), porém sem prejuízos para contagem da CNT. Dentre os 120 gatos, 64,2% (77/120) eram fêmeas e 35,8% (43/120) machos. Quanto às faixas etárias 17,5% (21/120) eram filhotes, 67,5% (81/120) jovens, 12,5% (15/120) jovens adultos e 2,5% (3/120) adultos.

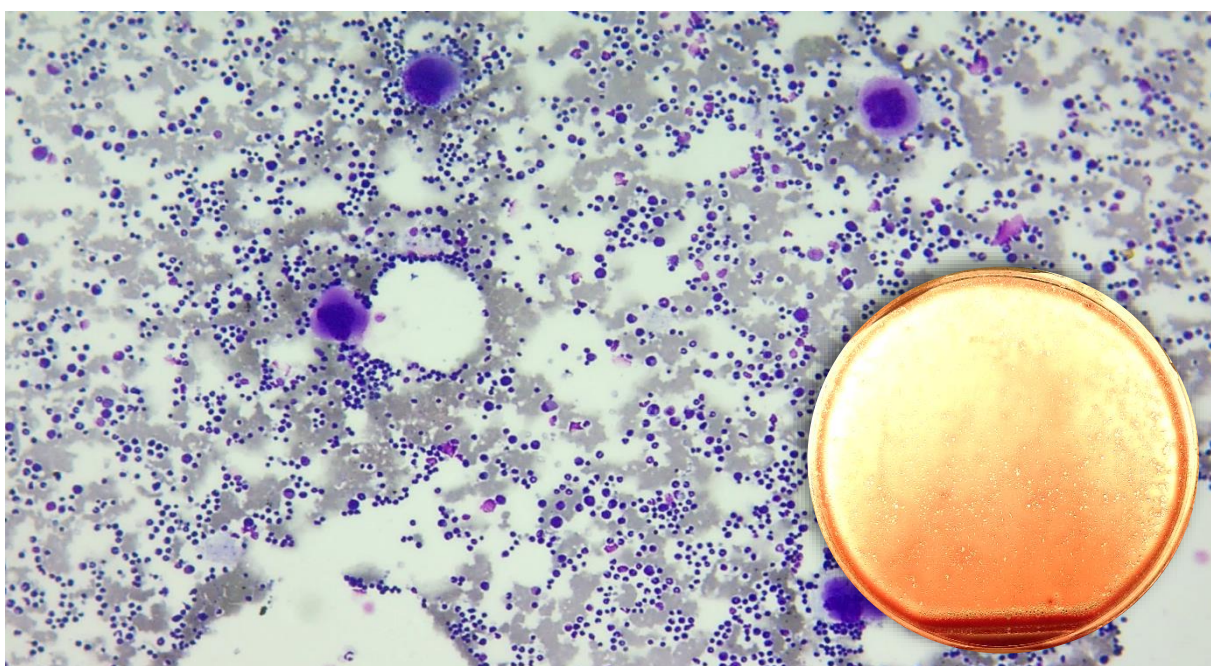
De forma coletiva, a média dos parâmetros hematológicos se encontrava dentro dos valores de referência (tabela 4), à exceção dos basófilos, que foram observados com maior frequência do que o esperado. Quando avaliados os hemogramas individualmente, 47% (57/120) não apresentavam nenhum tipo de alteração hematológica, entretanto, nos demais 63 (53%) foram observadas alterações hematológicas, considerando que mais de uma alteração poderia estar presente em cada paciente, como leucocitose (28/120; 23,3%), eosinofilia (23/120; 19,2%), neutrofilia (22/120; 18,3%), trombocitopenia (20/120; 16,7%), linfopenia isolada (17/120; 14,2%), basofilia (15/120; 12,5%), monocitose (12/120; 10%), linfocitose (8/120; 6,7%), anemia (2/120; 1,7%) e leucopenia (2/120; 1,7%).

Figura 8 - Aspirado medular de um gato, inapto para avaliação devido à coagulação excessiva, com abundantes agregados de plaquetas (cabeça de seta), com citoplasma eosinofílico e granular [May Grunwald-GIEMSA (MGG), x400]. **Insert.** Aspecto macroscópico da placa de Petri após a deposição desta mesma amostra.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 9 - Aspirado de medula óssea hemodiluído, contendo abundante contaminação por sangue periférico (MGG, x100). **Insert.** Aspecto macroscópico da placa de Petri após a deposição desta mesma amostra.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 4 - Valores obtidos no hemogramade 120 gatos clinicamente saudáveis submetidos à aspiração de medula óssea.

Parâmetro	Unidade	Média	Desvio Padrão	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência*
Eritrócitos	10 ⁶ /μL	7,6	1,3	7,6	6,7	8,4	5,5 ~ 10
Hemoglobina	g/dL	11,1	1,5	11,1	10	12,3	8 ~ 15
Hematócrito	%	33,8	5,1	33	30	37	24 ~ 45
VGM ¹	fL	45,1	5,5	44,1	41,6	48,1	39 ~ 55
CHGM ²	%	32,9	3,4	32,1	30,8	33,4	31 ~ 35
Plaquetas	10 ³ /μL	381	119	376	298	445	300 ~800
Leucócitos	/μL	14.108	6.712	12.330	8.424	18.175	5.000 ~ 19.500
Bastonetes	/μL	0	0	0	0	0	0 ~ 300
Segmentados	/μL	9.101	5.206	8.048	4.742	12.135	2.500 ~ 12.500
Linfócitos	/μL	3.412	2.125	2.895	2.092	3.944	1.500 ~ 7.000
Eosinófilos	/μL	1.154	1.153	818	552	1.369	0 ~ 1.500
Basófilos	/μL	118	180	0	0	165	Raros
Monócitos	/μL	348	189	205	99,8	460	0 ~ 850

¹Volume globular médio; ²Concentração de hemoglobina globular média; *Weiss e Wardrop, 2010.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Quanto à análise geral dos 120 aspirados de medula óssea, o número de espículas por amostra variou de 1 a 50 por lâmina, com média de 13,7 ($\pm 8,7$), e a densidade de 25% e 80%, com média de 44% ($\pm 15,3\%$). A relação mieloide/eritroide (M:E) variou de 0,7 a 2,3, com média de 1,50 ($\pm 0,3$), em que a contagem total de células mieloides foi no mínimo 189 e no máximo 333 (\bar{x} 261; $\pm 23,7$) e a das células da linhagem eritroide, no mínimo 112 e no máximo 271 (\bar{x} 178; $\pm 22,2$).

A contagem de megacariócitos alcançou em média 16,9 ($\pm 8,8$) células a cada dez campos de menor aumento (10x) e a de linfócitos em média 5,31 ($\pm 1,8$). Em raros casos, foram observados megacariócitos com emperipolese de neutrófilos.

A média de espículas nos animais filhotes foi 8,1 ($\pm 5,1$), com densidade média de 42,1% ($\pm 14,1$), já nos animais adultos as espículas alcançaram média de 16,3 ($\pm 7,2$) e densidade média de 56,7% (± 50). Na Tabela 5 estão descritos os dados quantitativos gerais por células avaliadas.

Tabela 5 - Análise descritiva da avaliação quantitativa dos aspirados de medula óssea com valores expressados em porcentagem (%) dos 120 gatos.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	Mediana	D.P. ¹	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		52,6	52,6	5,4	48,9	55,6	-
	Mieloblasto	1,6	1,6	0,8	1	2,2	0 ~ 0,4
	Promielócito	2,9	3	1,2	2,1	3,6	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	5,2	5,1	1,9	4	6,2	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	3,9	3,8	1,3	3,1	4,8	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	8,6	8	3,7	6,4	10	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	26,2	25,9	4	24,2	28,4	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,4	0,4	0,5	0	0,6	0,8 ~ 3,2 (soma da série eosinofílica)
	Metamielócito eosinofílico	0,5	0,4	0,5	0,2	0,8	
	Eosinófilo bastonete	0,9	0,8	0,6	0,4	1,2	
	Eosinófilo segmentado	1,9	1,8	1,2	1	2,6	0 ~ 0,4
	Série basofílica	0,3	0,2	0,3	0	0,4	
Eritroide		35,6	34,9	4,44	33,2	37,3	-
	Rubriblasto	1,1	1	0,6	0,6	1,4	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	5,3	4,9	2,4	4,9	6,8	0 ~ 1,6
	Rubricito	20,8	20,2	3,3	20,2	22,3	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	8,4	8,5	2,5	6,7	9,6	1,0 ~ 10,4
Outros		12	12,2	3,5	9,8	14,6	-
	Linfócitos	8,8	8,8	2,9	7,2	10,8	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,3	1,2	1,1	0,6	1,8	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,5	1,5	0,8	1	2	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,4	0,4	0,3	0	0,4	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,5	1,52	0,27	1,32	1,65	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.2 Gatos sem alterações hematológicas

Dentre os 57 (47%) isentos de alterações hematológicas, 68,4% (39/57) eram fêmeas e 31,6% (18/57) eram machos, com idade variando de 5 a 108 meses (\bar{x} 18,8; \pm 19,6), dentre os quais prevaleceram os animais jovens (56,1%; 32/57), seguidos pelos filhotes (26,3%; 15/57), jovens adultos (15,8%; 9/57) e adultos (1,8%; 1/57). Os dados dos hemogramas desses pacientes encontram-se na Tabela 6.

Na avaliação da medula óssea desses pacientes, na série mieloide se destacam os valores obtidos para mieloblastos (\bar{x} 1,6%; \pm 0,82), promielócitos (\bar{x} 3,7%; \pm 1,68) e neutrófilos segmentados (\bar{x} 26,3%; \pm 4,14). Já às células da linhagem eritroide, destaca-se a contagem de prorrubricitos (\bar{x} 4,9%; \pm 2), com mínimo de 1,4% e máximo de 9% por amostra. A média de linfócitos e plasmócitos observados na amostra foram, respectivamente, 9,1% (\pm 3) e 1,4% (\pm 1,3). A RME desses pacientes variou de 0,9 até 2,2, com média de 1,49. Os dados referentes à análise de medula óssea destes gatos estão descritos na Tabela 7. Células como tromboplastos

(precursores de megacariócitos), macrófagos (predominantemente *Nurse cells*), mastócitos, osteoclastos e monócitos, foram observados de forma ocasional, sem interferir de forma objetiva nos demais valores.

Tabela 6 - Valores de hemograma de 57 gatos sem alterações hematológicas submetidos à aspiração de medula óssea.

Parâmetro	Unidade	Média	Desvio Padrão	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência*
Eritrócitos	10 ⁶ /μL	7,7	1,1	7,6	6,9	8,5	5,5 ~ 10
Hemoglobina	g/dL	11	1,5	10,9	9,8	12,1	8 ~ 15
Hematócrito	%	33,7	4,7	32	30	37	24 ~ 45
VGM ¹	fL	44,2	4,5	43,5	41	46,3	39 ~ 55
CHGM ²	%	32,5	2,1	32,5	31,2	33	31 ~ 35
Plaquetas	10 ³ /μL	425	104	414	363	486	300 ~ 800
Leucócitos	/μL	10.738	3.265	11.277	7.568	12.890	5.000 ~ 19.500
Bastonetes	/μL	0	0	0	0	0	0 ~ 300
Segmentados	/μL	6.502	2.671	6.732	4.069	8.154	2.500 ~ 12.500
Linfócitos	/μL	3.183	1.475	2.884	2.229	3.765	1.500 ~ 7.000
Eosinófilos	/μL	768	451	647	494	901	0 ~ 1.500
Basófilos	/μL	96,4	202	0	0	124	Raros
Monócitos	/μL	189	186	124	75	289	0 ~ 850

¹Volume globular médio; ²Concentração de hemoglobina globular média; *Weiss e Wardrop, 2010.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 7 - Análise descritiva da avaliação quantitativa dos aspirados de medula óssea de 57 gatos sem alterações evidentes em hemograma.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	D.P. ¹	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		52,1	4,7	52,6	49	54,4	-
	Mieloblasto	1,6	0,8	1,6	1	2	0 ~ 0,4
	Promielócito	3,6	1,7	3,4	2,6	4,4	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	4,5	1,9	4,4	1	6	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	3,9	1,4	3,8	3	5	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	7,8	2,7	7,6	6	9,4	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	26,3	4,14	25,8	24,2	28,4	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,5	0,5	0,4	0,2	0,8	
	Metamielócito eosinofílico	0,6	0,6	0,4	0,2	0,8	0,8 ~ 3,2
	Eosinófilo bastonete	1	0,6	1	0,4	1,4	(soma da série eosinofílica)
	Eosinófilo segmentado	2	1,2	1,8	1,8	2,6	
	Série basofílica	0,4	0,37	0,4	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		35,6	4	35	33,2	37,4	-
	Rubriblasto	1,1	0,5	1	3,2	5,9	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	4,9	2	4,6	3,4	6,4	0 ~ 1,6
	Rubricito	21,4	3,7	20,2	18,8	23,6	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	8,4	2,5	8,2	6,8	9,6	1,0 ~ 10,4
Outros		12,2	3,7	12	10,8	15	-
	Linfócitos	9	3	8,8	7,6	11	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,4	1,3	1	0,4	1,8	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,4	0,7	1,4	1	2	0 ~ 0,2
	Série megacariocítica	0,4	0,4	0,4	0,2	0,6	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,49	0,25	1,34	1,54	1,65	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.3 Gatos com anemia

Os dois felinos que apresentavam alterações compatíveis com anemia eram machos, jovens, e com 24 meses de idade. Um deles com anemia microcítica normocrômica (Animal 1) e o outro anemia normocrítica normocrômica (Animal 2). Em um deles, notou-se eosinofilia discreta, sem demais alterações leucocitárias ou plaquetárias.

A linhagem eritroide nesses pacientes era superior à mieloide, com especial prevalência de prorrubricitos, até 10 vezes maior do que o valor preconizado pela referência, tal como apresentado na Tabela 8. Ambos os pacientes apresentaram relação mieloide/eritroide inferior a 1, respectivamente 0,95 e 0,88. Foi possível observar hiperplasia reacional da linhagem eritroide em ambos os casos (Figuras 10A-B).

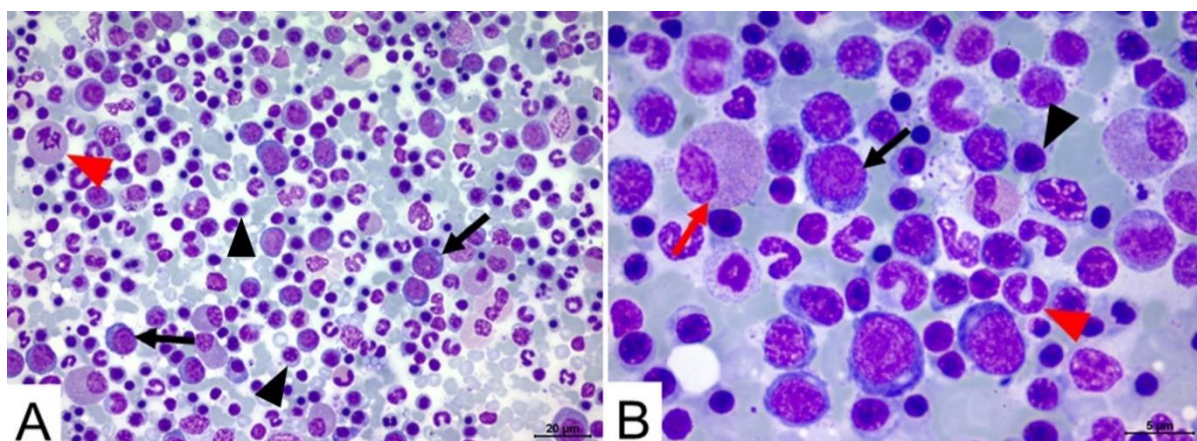
Tabela 8 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de dois gatos com quadro hematológico de anemia.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Animal 1		Animal 2		Referência Preconizada*
		%	N	%	N	
Mieloides		44	220	39,8	206	-
	Mieloblasto	3	15	0,6	3	0 ~ 0,4
	Promielócito	2,4	12	3	15	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	9,6	48	2,4	12	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	3	15	3	15	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	5	25	7,8	39	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	19,4	97	21,4	107	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0	0	0,4	2	
	Metamielócito eosinofílico	0	0	0	0	0,8 ~ 3,2
	Eosinófilo bastonete	0,4	2	0,2	1	(soma da série eosinofílica)
	Eosinófilo segmentado	1,2	6	0,8	4	
	Série basofílica	0	0	0,2	1	0 ~ 0,4
Eritroide		46,2	231	45,2	226	-
	Rubriblasto	1,4	7	1,4	7	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	11,6	58	9,8	49	0 ~ 1,6
	Rubricito	26	130	25,2	126	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	7,2	36	8,8	44	1,0 ~ 10,4
Outros		9,8	49	15	75	-
	Linfócitos	4,4	22	11,8	59	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	3	15	1,2	6	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	2	10	2	10	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,4	2	0	0	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		0,95	-	0,88	-	1,21 ~ 2,16

*Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 10 - Aspirado medular de um gato com hiperplasia eritroide. **A.** Notam-se rubriblastos (setas pretas) em moderada quantidade, seguidos por grande número de rubríctos (cabeças de seta preta) em diversas fases de maturação e amplo precursor granulocítico em processo de metáfase típica (cabeça seta vermelha) (x400). **B.** Imagem A aproximada, onde se nota proporção aumentada de rubriblastos (seta preta), prorrubríctos (cabeça de seta preta), e rubríctos em múltiplos estágios, em relação aos precursores granulocíticos, como mielócitos (seta vermelha) e neutrófilos bastonetes (cabeça de seta vermelha) (x1000) (MGG).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.4 Gatos com leucocitose

Vinte e oito (23,3%) dos 120 felinos apresentaram leucocitose, independentemente do tipo de células envolvida. Esses gatos eram distribuídos igualmente entre machos e fêmeas (14/28), e possuíam idade variando de 5 a 60 meses (\bar{x} 21,3; \pm 12,8), dentre os quais se notou predomínio de gatos com a faixa etária jovem (82,1%; 23/28), seguidos por jovens adultos (14,3%; 4/28) e filhotes (3,6%; 1/28). O valor médio de leucócitos desses animais foi de 24.093/ μ L (\pm 4.030), com mínimo de 19.500/ μ L e máximo de 35.550/ μ L, conforme demonstrado na Tabela 9. Destes 28, nove (34,1%) apresentavam leucocitose unicamente por neutrofilia de células maduras e sete (25%) por neutrofilia de células maduras, eosinofilia e monocitose, conforme Tabela 10.

O mielograma desses pacientes apresentou valores de mielócitos neutrofílicos (\bar{x} 2,9%; \pm 1,3%) e neutrófilos bastonetes (\bar{x} 11,1%; \pm 1,2%) inferiores aos previamente preconizados. Em contrapartida os neutrófilos segmentados alcançaram valores superiores (\bar{x} 26,1%; \pm 4,7%). Não foi observada hiperplasia da linhagem granulocítica

em nenhum desses casos, porém em um dos casos foram notados abundantes neutrófilos segmentados, alcançando 33% das 500 células avaliadas.

Tabela 9 - Valores de hemograma de 28 gatos com leucocitose submetidos à aspiração de medula óssea.

Parâmetro	Unidade	Média	Desvio Padrão	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência*
Eritrócitos	10 ⁶ /μL	7,3	1,2	7,6	6,5	8,1	5,5 ~ 10
Hemoglobina	g/dL	11,2	1,6	11	10,1	12,4	8 ~ 15
Hematócrito	%	33,6	4,9	33	29,8	38	24 ~ 45
VGM ¹	fL	46,3	4,6	46,5	42,5	49,4	39 ~ 55
CHGM ²	%	33,6	4,7	31,6	30,7	35	31 ~ 35
Plaquetas	10 ³ /μL	316	134	349	210	422	300 ~ 800
Leucócitos	/μL	24.093	4.030	23.950	20.728	26.275	5.000 ~ 19.500
Bastonetes	/μL	0	0	0	0	0	0 ~ 300
Segmentados	/μL	15.814	4.537	15.902	13.361	17.857	2.500 ~ 12.500
Linfócitos	/μL	5.183	2.723	4.331	3.012	7.125	1.500 ~ 7.000
Eosinófilos	/μL	2.151	1.857	1.576	1.003	2.377	0 ~ 1.500
Basófilos	/μL	186	229	204	0	254	Raros
Monócitos	/μL	757	543	664	366	1.195	0 ~ 850

¹Volume globular médio; ²Concentração de hemoglobina globular média; *Weiss e Wardrop, 2010.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 10 - Padrões observados nos leucogramas de 28 gatos com leucocitose, clinicamente saudáveis, submetidos à aspiração de medula óssea.

Leucograma	Número de casos	Percentual (%)
Neutrofilia madura	9	32,1
Neutrofilia madura, Eosinofilia e Monocitose	7	25
Neutrofilia madura e Eosinofilia	3	10,7
Neutrofilia madura e Linfocitose	3	10,7
Eosinofilia	2	7,1
Neutrofilia madura, Eosinofilia e Linfocitose	1	3,6
Linfocitose e Monocitose	1	3,6
Eosinofilia e Linfocitose	1	3,6
Linfocitose	1	3,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

O número de prorrubricitos nesses pacientes alcançou valores quase quatro vezes superiores (\bar{x} 5,8%; \pm 2,71%) ao valor máximo previamente determinado, sendo 11% o valor mais alto dentre eles. Todos os demais valores podem ser observados na Tabela 11. Destes, 92,9% (26/28) apresentaram características compatíveis com hiperplasia granulocítica reativa, mas somente em 7,1% (2/28) observou-se RME aumentado.

Tabela 11 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 28 gatos com leucocitose, clinicamente saudáveis.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	D.P. ¹	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		54	7,1	53,3	48,9	58	-
Mieloblasto		1,5	0,8	1,2	0,8	1,9	0 ~ 0,4
Promielócito		2,9	1,3	3	1,9	3,3	0 ~ 3
Mielócito neutrofílico		5,1	2,2	5	3,6	6	4,4 ~ 13,2
Metamielócito neutrofílico		3,9	1,2	3,6	3,2	4,8	0,6 ~ 8,0
Neutrófilo bastonete		11,1	5,6	9,8	8,1	11,6	12,8 ~ 16,6
Neutrófilo segmentado		26,1	4,7	27	24,3	28,9	6,8 ~ 22,0
Mielócito eosinofílico		0,2	0,3	0	0	0,4	0,8 ~ 3,2 (soma da série eosinofílica)
Metamielócito eosinofílico		0,5	0,4	0,4	0,2	0,7	
Eosinófilo bastonete		0,7	0,6	0,6	0,4	1	
Eosinófilo segmentado		1,8	1,1	1,6	0,9	2,3	
Série basofílica		0,2	0,2	0	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		35,1	5,7	35,4	32,8	37,3	-
Rubriblasto		0,8	0,5	0,8	0,5	1,2	0 ~ 0,8
Prorrubricito		5,8	2,7	5,6	3,5	7,3	0 ~ 1,6
Rubricito		19,8	3	19,6	18,6	21,2	10,2 ~ 29,4
Metarrubricito		8,7	3,2	9	6,5	10,3	1,0 ~ 10,4
Outros		12	3,55	13,2	9,5	14,7	-
Linfócitos		8,7	2,9	9,1	6,9	10,8	11,6 ~ 21,6
Plasmócitos		1,4	0,9	1,2	0,8	1,9	0,2 ~ 1,6
Monócitos		1,6	0,9	1,6	1,1	2	0 ~ 0,2
Série tromboblástica		0,3	0,3	0,4	0	0,4	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,52	0,32	1,3	1,47	1,66	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.5 Gatos com neutrofilia

A neutrofilia foi observada em 18,3% (22/120) dos gatos. Desses, 63,6% (14/22) eram machos e 36,4% (6/22) fêmeas, com idade média de 20,3 ($\pm 13,8$) meses e predomínio de animais da faixa etária jovem (81,8%; 18/22), seguido por jovem adulto (13,6%; 3/22) e filhote (4,5%; 1/22). A média de neutrófilos segmentados observados foi de 17.506/ μ L (± 3.375), entretanto não foram observados neutrófilos bastonetes nesses pacientes. Os demais valores obtidos por hemograma estão expressados na Tabela 12.

Neutrofilia isolada foi observada em oito (36,7%) dos casos, os demais foram associados com eosinofilia e monocitose (31,8%; 7/22), eosinofilia (13,6%; 3/22), linfocitose (9,1%; 2/22) e “linfocitose com eosinofilia”, “linfocitose com monocitose” e “monocitose” com 4,5% (1/22) cada.

A avaliação quantitativa da medula óssea desses gatos foi muito semelhante à observada nos pacientes com leucocitose (Tabela 13). Ressalta-se que dos 22

animais, 21 apresentavam números de neutrófilos segmentados intramedulares acima do valor máximo indicado no intervalo de referência, desta forma compatível com um quadro de hiperplasia granulocítica de ordem neutrofilica.

Tabela 12 - Valores de hemograma de 22 gatos com neutrofilia submetidos à aspiração de medula óssea.

Parâmetro	Unidade	Média	Desvio Padrão	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência*
Eritrócitos	10 ⁶ /μL	7,3	1,2	7,7	6,5	8,2	5,5 ~ 10
Hemoglobina	g/dL	11,1	1,5	11,2	9,8	12,5	8 ~ 15
Hematócrito	%	34,1	5,3	33	29,3	39,5	24 ~ 45
VGM ¹	fL	46,7	4,4	46,5	43,3	49,1	39 ~ 55
CHGM ²	%	32,9	3,7	31,4	30,7	33,2	31 ~ 35
Plaquetas	10 ³ /μL	344	116	352	288	430	300 ~ 800
Leucócitos	/μL	24.684	4.165	24.671	21.080	26.425	5.000 ~ 19.500
Bastonetes	/μL	0	0	0	0	0	0 ~ 300
Segmentados	/μL	17.506	3.375	16.451	15.300	18.876	2.500 ~ 12.500
Linfócitos	/μL	4.450	2.037	3.970	3.000	5.878	1.500 ~ 7.000
Eosinófilos	/μL	1.700	1.076	1.475	1.021	2.237	0 ~ 1.500
Basófilos	/μL	179	237	101	0	253	Raros
Monócitos	/μL	848	547	751	408	1.211	0 ~ 850

¹Volume globular médio; ²Concentração de hemoglobina globular média; *Weiss e Wardrop, 2010.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 13 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 22 gatos com neutrofilia, clinicamente saudáveis.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	D.P. ¹	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		54,4	7,23	52,6	48,6	58,3	-
	Mieloblasto	1,5	0,8	1,2	0,9	1,7	0 ~ 0,4
	Promielócito	2,7	1,2	2,3	1,6	3,2	0 ~ 3
	Mielócito neutrofilico	5,1	2,4	4,6	3,7	6	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofilico	4,1	1,2	3,9	3,4	4,8	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	11,2	6,2	9,3	8,1	11,3	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	26,6	4,1	27	24,1	29,1	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,2	0,3	0	0	0,4	
	Metamielócito eosinofílico	0,5	0,4	0,4	0,3	0,6	0,8 ~ 3,2
	Eosinófilo bastonete	0,6	0,4	0,4	0,4	0,9	(soma da série eosinofílica)
	Eosinófilo segmentado	1,8	1	1,6	1,1	2,2	
	Série basofílica	0,2	0,3	0	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		31	4,7	35	32,4	36,9	-
	Rubriblasto	0,7	0,4	0,6	0,5	0,9	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	5,7	2,8	5,6	3,3	6,9	0 ~ 1,6
	Rubricito	19,2	3	19	18,3	20,7	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	8,3	2,5	9	6,1	10,4	1,0 ~ 10,4
Outros		13	2,86	13,7	11,8	15	-
	Linfócitos	9,5	2,5	9,6	8,3	10,8	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,5	0,9	1,3	0,9	2,1	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,7	0,9	1,6	1,2	2	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,3	0,3	0,4	0	0,4	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,55	1,46	0,31	1,3	1,74	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.6 Gatos com eosinofilia

O aumento do número de eosinófilos circulantes foi identificado em 19,2% (23/120) dos gatos. Desses, 78,3% (18/23) eram fêmeas e 21,7% (5/23) machos. A idade média desses animais era 20,6 ($\pm 13,9$) meses, em que os jovens ocupavam 73,9% (17/23) dos casos. Não havia alterações no eritrograma desses pacientes, entretanto, 12 (13%) apresentavam leucocitose 19.960/ μL a 35.550/ μL . A quantidade média de eosinófilos observados nesses pacientes foi de 2.827/ μL (± 1.692). A avaliação quantitativa da medula óssea desses gatos foi muito semelhante à observada nos pacientes com leucocitose e neutrofilia, com exceção dos prorrubricitos (\bar{x} 6,3%; $\pm 2,9\%$) e a soma das médias de células da linhagem eosinofílica ($\Sigma \bar{x}$ 3,9%), ambas aumentadas quando comparadas à referência preconizada (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 23 gatos com eosinofilia, clinicamente saudáveis.

Linagem	Células Avaliadas (%)	Média	D.P. ¹	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		53,8	6,3	53,8	51,7	56,8	-
	Mieloblasto	1,6	0,8	1,4	1	2,2	0 ~ 0,4
	Promielócito	3,1	1,4	3,2	1,7	3,8	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	5,5	2,7	5,4	3,5	7,4	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	4,2	1,2	4	3,3	4,9	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	10	4,8	10	7,1	11,1	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	25,3	4,7	25,8	24	27,2	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,3	0,4	0,2	0	0,4	0,8 ~ 3,2 (soma da série eosinofílica)
	Metamielócito eosinofílico	0,5	0,4	0,4	0,4	0,7	
	Eosinófilo bastonete	0,9	0,6	0,8	0,5	1,2	
	Eosinófilo segmentado	2,1	1,4	1,6	1,2	2,4	
	Série basofílica	0,3	0,3	0,4	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		35,2	6,1	35	32,8	36,7	-
	Rubriblasto	1,07	0,7	1	0,7	1,5	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	6,8	2,9	5,6	4,3	7,8	0 ~ 1,6
	Rubricito	20	3,4	20,4	18,8	22,1	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	7,82	3,3	7,6	5,9	8,7	1,0 ~ 10,4
Outros		11,3	3,3	11,8	9,5	13,6	-
	Linfócitos	8	2,6	8	6,7	9,3	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,4	0,9	1,2	0,8	1,8	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,6	1	1,8	0,9	2,3	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,3	0,2	0,4	0	0,5	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,55	0,31	1,38	1,46	1,7	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Dentre os gatos com eosinofilia, durante avaliação citológica de medula óssea ainda se encaixam os dois casos de hiperplasia eritroide previamente citados (8,7%, 2/23) e 21 (91,3%) casos de hiperplasia granulocítica de ordem neutrofílica. Dentre os 21, oito (38,1%) também tiveram número de eosinófilos intramedulares (somando todas as fases de maturação) superiores ao preconizado pelo intervalo de referência determinado por Jain (1993a).

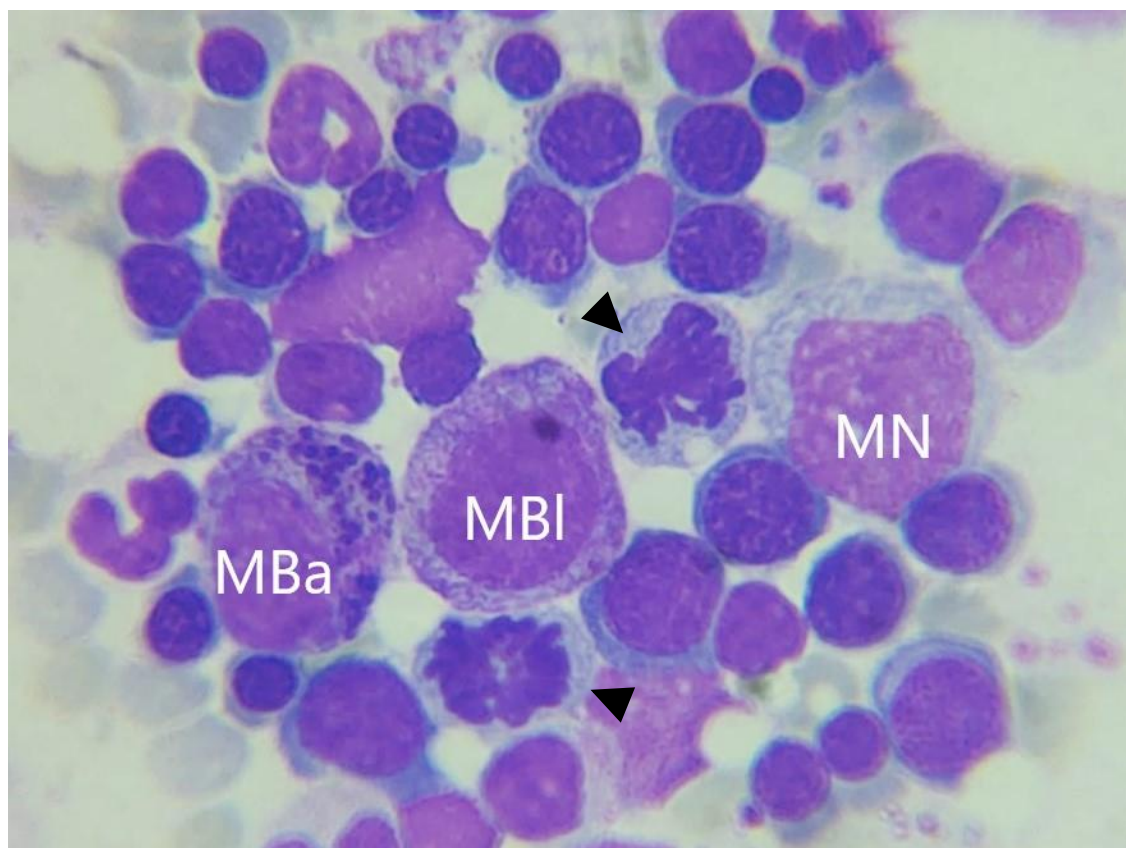
5.3.7 Gatos com basofilia

Somente 12,5% (15/120) apresentaram aumento significativo no número de basófilos na hematologia. As fêmeas totalizaram 66,7% (10/15), enquanto os machos 33,3% (5/15), e a média de idade desses animais foi de 15,4 ($\pm 1,3$) meses, com mínimo de cinco e máximo de 30 meses. A faixa etária jovem foi predominante (80%; 12/15), seguida pelos filhotes (13,3%; 2/15) e jovem adulta (6,7%; 1/15).

Durante avaliação do hemograma desses animais, observou-se uma média de basófilos circulantes de 407/ μ L (± 321), com mínimo de 101 e máximo de 1259/ μ L. Leucocitose total foi constatada em 53,3% (8/15) destes pacientes, e todos apresentavam eosinofilia associada. Além disso, durante avaliação do eritrograma, notou-se que os dois animais previamente descritos como portadores de anemia, também se incluíam dentre os com basofilia.

A avaliação quantitativa da medula óssea desses pacientes foi semelhante às anteriormente citadas, com um aumento evidente no número de células da linhagem eritroide. Apesar da basofilia, não foi constatado aumento na média de precursores de basófilos (\bar{x} 0,3%; \pm 0,3%) (Figura 11) em comparação aos animais com demais condições hematológicas. À avaliação qualitativa da medula óssea, notou-se que destes casos, 14 (93,3%) demonstravam hiperplasia granulocítica de ordem neutrofílica, e o residual, um quadro de hiperplasia eritroide, que foi previamente citado dentre os animais com anemia.

Figura 11 - Aspirado medular de um gato clinicamente saudável. Observar um mielócito basófilo (MB) ao lado de um mieloblasto (MBI) e de um mielócito neutrófilo (MN), acompanhados por duas células em processo mitótico de metafase (cabeças de seta pretas) e múltiplos precursores eritroides e linfócitos (x1000, MGG).



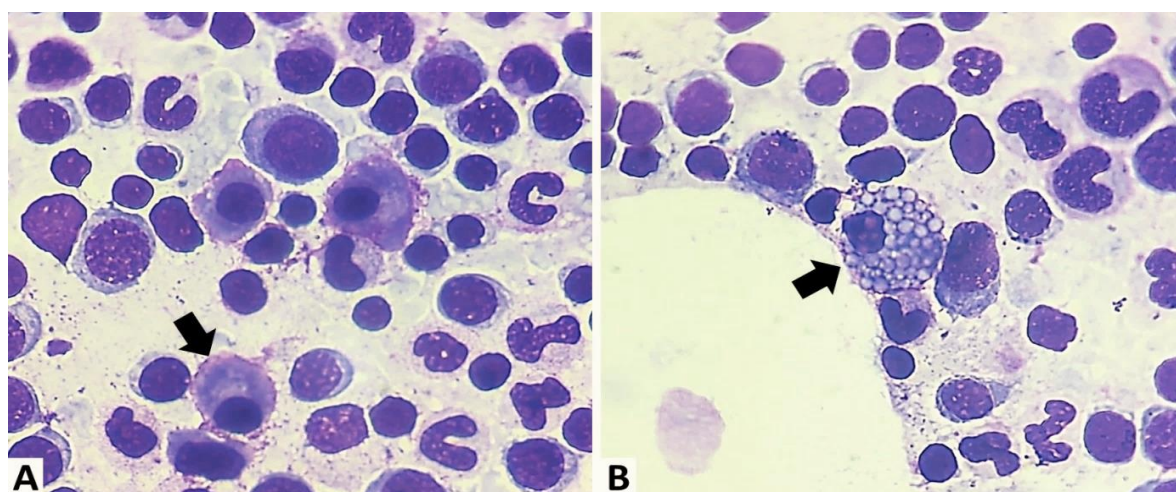
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.8 Animais com linfocitose

Oito animais (6,7%) apresentaram linfocitose, divididos igualmente entre machos e fêmeas, dos quais 87,5% (7/8) eram jovens e, somente um, jovem adulto, com média de idade de 20,1 ($\pm 9,9$) meses. Os valores de linfócitos nesses pacientes variaram de 7.096 a 12.658/ μL (\bar{x} 8.735/ μL ; $\pm 1.739/\mu\text{L}$), sendo o paciente com maior número de linfócitos um gato jovem, com 12 meses de idade. Um dos pacientes apresentava conjuntamente uma anemia discreta, os demais parâmetros estavam dentro da normalidade. Nenhum dos animais apresentava linfocitose isolada, mas sempre associado com o aumento de outra série de leucócitos. A associação de linfocitose com “neutrofilia e eosinofilia”, “neutrofilia” e “eosinofilia” totalizaram dois (25%) casos cada, assim como “neutrofilia, eosinofilia e monocitose” e “monocitose” um (12,5%) caso cada.

A avaliação de medula óssea desses animais, quando comparada à referência preconizada, demonstrou aumento no número de mieloblastos (\bar{x} 1,8%; $\pm 0,7\%$) e promielócitos (\bar{x} 3,1%; $\pm 1,6\%$), bem como de neutrófilos segmentados (\bar{x} 25,9; $\pm 2,4\%$). Já na linhagem eritroide, o número de prorrubricitos foi o único precursor com valor superior ao previamente descrito, com média de 5,67% ($\pm 2\%$). Não se observou abundância de linfócitos no esfregaço de medula óssea, entretanto, nesse grupo o número de linfócitos intramedulares foi o mais próximo ao preconizado por Jain (1993a), com média de 10,2% ($\pm 4\%$). Além disso quatro desses gatos (50%) demonstraram plasmócitos em maior quantidade, variando de 1,6 a 2,4% (\bar{x} 2; $\pm 0,4\%$) das células medulares. Os casos com maior número de plasmócitos na amostra, foi possível observar grande quantidade de *flame cells* (Figura 12A) e em dois casos (25%) células de Mott em moderada quantidade (Figura 12B).

Figura 12 - Aspirado medular de dois gatos com linfocitose. **A.** Abundantes plasmócitos com membrana citoplasmática irregular, e citoplasma com margens intensamente eosinofílicas, caracterizando as *flame cells* (seta preta). **B.** Plasmócitos amplo, repleto por vesículas opticamente vazias e de tamanhos similares (Corpúsculos de Russel), caracterizando uma célula de Mott (seta preta) (MGG, x1000).



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.9 Gatos com monocitose

Os monócitos estavam aumentados em 12 (10%), onde as fêmeas eram mais numerosas (7/12; 58,3%) em relação aos machos (5/12; 41,7%), com idade média de 20,8 ($\pm 13,8$) meses, onde o gato mais novo tinha 5 meses e o mais velho, 48.

Novamente, os animais jovens prevaleceram, com 66,7% (8/12) dos casos, frente aos jovens adultos (3/12; 25%) e jovem (1/12; 8,3%).

A monocitose variou de 1.048/ μ L a 2.028/ μ L, com média de 1.361/ μ L (\pm 1.269/ μ L). Apesar de não serem observadas alterações no eritrograma, o número médio de plaquetas observados foi 301 $\times 10^3$ / μ L, extremamente próximo ao limite mínimo de plaquetas de acordo com Jain (1993a). Já no leucograma, observou-se leucocitose em 10 (83,3%) animais, nos quais, além da monocitose, predominou a neutrofilia (9/12; 75%), seguido por eosinofilia (8/12; 66,8%), basofilia (6/12; 50%) e linfocitose (2/12; 16,8%).

A avaliação citológica da medula óssea demonstrou valores de monócitos evidentemente superiores ao limite máximo da referência preconizada, no mínimo de 0,4% e máximo de 2,2%, com média de 1,6% (\pm 1,1%). Na Tabela 15 estão descritos os demais valores obtidos na avaliação quantitativa da medula óssea. Em um dos casos, grande quantidade de neutrófilos maduros foi observado.

Tabela 15 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 12 gatos com monocitose, clinicamente saudáveis.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	Mediana	D.P. ¹	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		56,3	54,3	7,92	52,9	56,5	-
	Mieloblasto	1,5	1,1	1	0,8	2,1	0 ~ 0,4
	Promielócito	3,1	3,1	1,6	1,6	3,6	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	5,7	5,5	2,8	4	6,5	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	3,9	3,8	1,5	2,7	4,8	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	12,6	9,7	7,9	7,8	13,7	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	25,6	25,1	4,4	24,2	28,2	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,4	0,4	0,3	0,1	0,5	
	Metamielócito eosinofílico	0,6	0,5	0,4	0,4	0,8	0,8 ~ 3,2
	Eosinófilo bastonete	0,8	0,8	0,4	0,5	1	(soma da série eosinofílica)
	Eosinófilo segmentado	1,7	1,7	0,9	1,1	2	
	Série basofílica	0,3	0,4	0,3	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		34,2	34,8	5,95	31,7	37,5	-
	Rubriblasto	1,1	1	0,7	0,7	1,3	0 ~ 0,8
	Prorrubricito	5,3	4,9	2,4	4	6,7	0 ~ 1,6
	Rubricito	19,7	19,6	3,9	18,9	22,7	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	8	8,4	2,3	5,9	9,6	1,0 ~ 10,4
Outros		12,5	12,7	3,55	11,9	15,5	-
	Linfócitos	8,8	8,8	3	8,1	10,6	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,4	1,2	0,9	0,9	1,7	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,6	1,5	1,1	0,9	1,9	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,4	0,3	0,4	0	0,7	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,54	1,5	0,3	1,34	1,68	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.10 Gatos com leucopenia

Somente dois (1,4%) gatos apresentaram redução do número total de leucócitos circulantes no organismo, duas fêmeas com 18 meses. Na avaliação hematológica, os leucócitos desses pacientes alcançaram valores de 4.400/ μ L e 4.800/ μ L, em ambas as vezes em decorrência de linfopenia, 480 e 1.232 linfócitos por microlitro, respectivamente. Não haviam alterações evidentes na série vermelha, porém em um dos casos o valor de plaquetas foi discretamente inferior ao mínimo preconizado pelo intervalo de referência, alcançando 295 $\times 10^3$ / μ L.

À avaliação quantitativa da medula óssea desses pacientes foi possível notar mieloblastos alcançando valor médio superior ao preconizado pela referência atual, 1,9% respectivamente. Entretanto, o número médio de neutrófilos bastonetes, para ambos os casos, apresentava-se abaixo do preconizado com 7,4% (IR= 12,8-16,6%). Nenhuma alteração morfológica foi evidenciada, nem nas lâminas do esfregaço sanguíneo, nem na medula óssea desses pacientes.

5.3.11 Gatos com linfopenia

A linfopenia foi observada nas amostras sanguíneas de 17 (14,2%) animais. Destes, 64,7% (11/17) eram fêmeas e 35,3% (6/17) machos, com idade média de 27,4 ($\pm 29,1$) meses, variando de 6 a 108 meses. Jovens foram predominantes, com 70,6% (12/17) dos casos, seguidos por adultos e filhotes, com 11,8% (2/17) cada, e somente um animal jovem adulto.

Os valores de linfócitos dos pacientes variaram de 480/ μ L até 1.493/ μ L, próximo ao limite inferior mínimo, com média de 1.129/ μ L (± 279 / μ L). Notou-se neutrofilia em quatro (23,5%) dos 17 animais, não excedendo 14.370 neutrófilos por μ L. No esfregaço medular desses gatos, somente dois (11,76%) tinham valores de linfócitos dentro do esperado pela referência previamente determinada, todos os demais demonstravam valores inferiores. A média total de linfócitos nos aspirados de medula foi 8,2% ($\pm 3,1$), com mínimo de 1,2% e máximo de 13,6%. A contagem de todas as linhagens de células da medula óssea está transcrita na Tabela 16.

A contagem medular de monócitos de todos os 17 animais apresentava-se no limite máximo ou acima dos valores preconizados. Não foram observadas alterações morfológicas nos precursores medulares dignas de nota em nenhuma das 17 amostras.

Tabela 16 - Resultados quantitativos da avaliação citológica de aspirados de medula óssea de 17 gatos com quadro hematológico compatível com linfopenia, porém clinicamente saudáveis.

Linhagem	Células Avaliadas (%)	Média	D.P. ¹	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Referência Preconizada*
Mieloides		51,7	4,26	51,4	48,4	54,8	-
	Mieloblasto	2	0,7	1,6	1,6	2,4	0 ~ 0,4
	Promielócito	2,9	0,7	2,6	2,4	3,4	0 ~ 3
	Mielócito neutrofílico	5,3	1,6	4,8	4,4	6,2	4,4 ~ 13,2
	Metamielócito neutrofílico	3,8	0,9	3,8	3,2	4,6	0,6 ~ 8,0
	Neutrófilo bastonete	7,4	2,5	7	5,8	8,4	12,8 ~ 16,6
	Neutrófilo segmentado	25,8	3,2	25	24,2	26,6	6,8 ~ 22,0
	Mielócito eosinofílico	0,5	0,5	0,4	0,2	0,8	0,8 ~ 3,2 (soma da série eosinofílica)
	Metamielócito eosinofílico	0,5	0,4	0,4	0,2	0,8	
	Eosinófilo bastonete	1	0,4	1	0,8	1,4	
	Eosinófilo segmentado	2,3	1,1	2,4	1,4	3	
	Série basofílica	0,2	0,2	0	0	0,4	0 ~ 0,4
Eritroide		36,1	3,9	34,4	33	38	-
	Rubriblasto	1,2	0,7	1	0,8	1,4	0 ~ 0,8
	Prorubricito	5,3	2,4	5,2	3,6	6,8	0 ~ 1,6
	Rubricito	21,1	3,	20,6	19	22,8	10,2 ~ 29,4
	Metarrubricito	8,5	2,1	8,4	7,2	9,6	1,0 ~ 10,4
Outros		11,4	3,28	12	9,2	13,6	-
	Linfócitos	8,2	3	8,8	6	9,8	11,6 ~ 21,6
	Plasmócitos	1,4	0,9	1,2	0,6	2	0,2 ~ 1,6
	Monócitos	1,5	0,8	1,6	0,8	2	0 ~ 0,2
	Série tromboblástica	0,3	0,2	0,4	0	0,4	Raros
Relação Mieloide/Eritroide		1,465	0,24	1,27	1,5	1,65	1,21 ~ 2,16

¹Desvio Padrão; *Referência previamente instituída por Jain (1993a), utilizando amostras de 7 gatos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.4 DISCUSSÃO

Os animais da espécie felina têm uma maior chance de desenvolver alterações hematopoiéticas quando comparados aos demais animais, no entanto, constatou-se, com base em pesquisas nos bancos de dados, que estudos descrevendo parâmetros básicos de avaliação dos aspirados de medula óssea são escassos, e comumente tratam de aspectos citomorfológicos (STACY; HARVEY, 2017), sem abordarem atualizações na avaliação quantitativa deste órgão, permanecendo a utilização de

referências datadas de várias décadas atrás (GILMORE; GILMORE; JONES, 1964; JAIN, 1993a).

Quanto à avaliação geral dos aspirados, os dados deste trabalho permitiram observar que a quantidade de espículas medulares obtidas foi superior em animais adultos, contradizendo o que se esperaria quando consideramos as características fisiológicas desses pacientes, em que com o crescimento, o espaço medular se expande e descentraliza o tecido medular, alocando maiores áreas preenchidas por tecido adiposo (HARVEY, 2012a).

A média de espículas medulares obtidas em gatos jovens e jovens adultos foi similar, porém, considerando o número de gatos jovens avaliados e o valor máximo de espículas obtidas, crê-se que haja maior disponibilidade de espículas avaliáveis nessa faixa etária. Relata-se que quanto menor a idade dos gatos, maior a atividade e disponibilidade medular para avaliação (HARVEY, 2012a; PERMAN; OSBORNE; STEVENS, 1974), porém, diferente do que se esperava, os filhotes demonstraram menor quantidade de espículas na amostra em comparação às demais faixas etárias.

Quanto ao gênero, os machos resultaram maior número de espículas viáveis em relação às fêmeas. Mesmo considerando que o número de gatas fêmeas foi relativamente maior, ressalta-se que a quantidade mínima e máxima de espículas observadas nos machos ainda foi superior, descartando que essa diferença ocorreu como consequência da quantidade de animais por grupo. Um estudo realizado em humanos avaliando a quantidade de células nucleadas obtidas da medula óssea por aspirado, identificou que há uma redução progressiva do número de células com o avanço da idade, porém, não identificou diferenças significativas entre os gêneros (MUSCHLER et al., 2001). Até o presente momento não há trabalhos disponíveis que discorram sobre a distribuição do número de espículas medulares obtidas de acordo com o gênero e idade em gatos, limitando uma explicação satisfatória sobre este fato. Para os autores, acredita-se que não exista uma relação direta desses fatores com o número de espículas nas amostras, tal como identificado no estudo supracitado, sendo esse um achado ocasional.

Quanto à densidade medular, também denominada de densidade de espícula, notou-se que gatos da faixa etária jovem adulta demonstraram maior celularidade disponível para avaliação, em contrapartida, os animais adultos apresentaram a menor celularidade por lâmina. Considerando que a densidade está relacionada à proporção de precursores e adipócitos compondo a espícula (MYLONAKIS; HATZIS,

2014; STACY; HARVEY, 2017), ressalta-se que além de alterações displásicas intrínsecas à medula óssea, outros fatores como aumento da deposição de gordura intramedular decorrentes do avanço da idade e quadros de obesidade (AMBROSI et al., 2017; MENAGH et al., 2010). Até o momento da colheita das amostras, nenhum dos gatos avaliados neste trabalho apresentavam-se obesos ou com disfunções endocrinológicas evidentes, creditando os valores de densidade unicamente ao avanço da idade.

Os megacariócitos foram avaliados de forma quantiquantitativa e não foram observadas alterações significativas, principalmente no que diz respeito às características morfológicas específicas, como citoplasma e núcleo. Assim como descrito em outras espécies, os megacariócitos se apresentaram como células amplas, discretamente granulares e com múltiplos núcleos dispostos na forma de conglomerados (BOLLIGER, 2004; STACY; HARVEY, 2017).

Nos gatos adultos os megacariócitos foram numericamente superiores que nas demais faixas etárias. Essa constatação também foi encontrada em um estudo avaliando a atividade megacariocítica em camundongos e, acredita-se, que está relacionada com o aumento da atividade de trombopoetina e seu respectivo receptor, MPL (KANAGASABAPATHY et al., 2020). Não houve alteração significativa na quantidade de megacariócitos em nenhum dos grupos avaliados, o que foi compatível com a condição de saúde dos pacientes.

Em raros casos, observaram-se megacariócitos maduros realizando emperipoese de neutrófilos segmentados, tal como descrito em outras espécies (CARTER; CREGAR; AULBACH, 2017), incluindo humanos. Esse processo ainda é pouco elucidado, mas acredita-se que sua natureza em condições favoráveis de higiene esteja atrelada à restrição de espaço na medula óssea, ou até mesmo com via de acesso para a circulação (CUNIN; NIGROVIC, 2020; RASTOGI et al., 2014; TAVASSOLI, 1986). Adicionalmente, a emperipoese megacariocítica pode ser observada em doenças mieloproliferativas, envolvendo inúmeros tipos distintos de leucemia (LEE, 1989; SABLE et al., 2009), entretanto, nos animais desse projeto, essas alterações não foram diagnosticadas.

Os 57 gatos sem alterações hematológicas tiveram valores na contagem total de células medulares diferentes do esperado quando comparados com o descrito por Jain (1993a), e também com os valores encontrados por Turinelli e Gavazza (2018) durante um estudo retrospectivo, no qual a discrepância mais evidente estava

relacionada aos valores totais de precursores mieloides e eritroides que, no presente trabalho, foi aproximadamente 10% superior na linhagem mieloide e 10% inferior na linhagem eritroide.

Apesar de clinicamente saudáveis, a maior parte dos animais avaliados nesse estudo são provenientes da rotina de castrações do CCZ-Lages, que atende em sua maioria a população em situação de vulnerabilidade social da região, onde são inconstantes as medidas de controle e profilaxia de doenças nos animais. Esse fato que nos leva a especular se, devido a essa exposição constante e intensa a inúmeros desafios imunológicos, ocorram estímulos constantes a granulopoiese, algo já bem elucidado (HARVEY, 2012a, 2012b; STACY; HARVEY, 2017). Alterações hematopoiéticas relacionadas ao ambiente já foram descritas em ovelhas, principalmente às altas temperaturas (SILVA; COSTA; SOBRINHO, 1992), entretanto, não há estudos que avaliem a influência desses fatores no sangue de gatos. Desta forma, especula-se que esse processo granulopoiético observado no estudo é aparentemente uma resposta adaptativa ao ambiente ao qual esses animais habitavam, conduzindo ao aumento do número de precursores mieloides intramedulares.

Essa condição de vida também é importante para explicar o maior número de mieloblastos observados nesses animais, quando comparados aos demais estudos (JAIN, 1993a; TURINELLI; GAVAZZA, 2018). Os mieloblastos, componentes primários do compartimento mitótico dos granulócitos, são considerados normais para Jain (1993a) quando alcançam valores que variam entre 0 e 0,4%, porém, a média observada nos pacientes avaliados nesse estudo foi de 1,49%, mesmo nos animais sem quaisquer alterações clínico-hematológicas. Ressalta-se que apesar dos mieloblastos poderem ser classificados em tipos I, II e III, e essas características permitirem à diferenciação entre tipos distintos de leucemias (HARVEY, 2012a; JAIN et al., 1991), nesse estudo essa classificação não foi realizada, principalmente devido à ausência de casos em que o número de mieloblastos excedeu 5%, o valor considerado para configurar um quadro de síndrome mielodisplásica (HARVEY, 2012b; MYLONAKIS; HATZIS, 2014; WEISS, 2006).

Os prorrubricitos nos pacientes sem alterações hematológicas evidentes se apresentaram aumentados em comparação ao descritos por Jain (1993a), mas em outros estudos essas células também estavam numericamente superiores, sem serem

considerados um processo patológico (GILMORE; GILMORE; JONES, 1964; TURINELLI; GAVAZZA, 2018).

A respeito da RME nos animais sem alterações hematológicas, os valores obtidos variavam de 0,9 a 2,24. O valor mínimo obtido nesta pesquisa transita para baixo do valor mínimo preexistente, que é 1,21 (JAIN, 1993a), e possivelmente conduziria o avaliado à determinação de um quadro compatível com uma possível hiperplasia eritroide ou hipoplasia granulocítica, dependendo dos critérios utilizados. Entretanto, outros trabalhos que avaliaram a celularidade normal da medula óssea de gatos acharam resultados de RME até mesmo inferiores aos valores encontrados neste trabalho, variando de 0,31 até 0,6 (GILMORE; GILMORE; JONES, 1964; TURINELLI; GAVAZZA, 2018), demonstrando que a RME deve ser avaliada com cuidado e em associação com as demais alterações medulares e hematológicas (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002; GRINDEM; TYLER; COWELL, 2007). É importante frisar também, que o intervalo de referência informado por Jain (1993a) é baseado num número restrito de sete animais.

Outra observação importante está atrelada ao número médio de precursores eosinofílicos nestes gatos, que somados superam o valor máximo estipulado em aproximadamente 25%. Estudos demonstram que um quadro de hiperplasia de precursores eosinofílicos só pode ser determinado quando os valores de precursores superam 6% das CNT (HARVEY, 2012a, 2012b; STACY; HARVEY, 2017; TURINELLI; GAVAZZA, 2018), portanto, esse achado não foi considerado relevante quando avaliado em comparação com o hemograma, já que não havia eosinofilia em nenhum desses pacientes. Ademais, esses precursores eram típicos e não apresentavam nenhum tipo de alteração morfológica significativa, nuclear ou citoplasmática, importantes para indicar uma disgranulopoiese (HARVEY, 2012b; MYLONAKIS; HATZIS, 2014). Não é possível descartar que essa alteração seja simplesmente fisiológica e transitória.

Em um dos dois animais com quadro de anemia, observou-se que 3% das CNT da medula óssea compreendiam mieloblastos, equivalente a no mínimo sete vezes os valores indicados por Jain (1993a). Existe uma condição mielodisplásica bem conhecida em humanos denominada de anemia refratária com excesso de blastos (RAEB, do inglês "*Refractory Anemia with Excess Blasts*"), que é caracterizada por quadros de anemia microcítica ou normocítica e normocrômica associados a um aumento de mieloblastos intramedulares e circulantes (HARVEY, 2012b; LICHTMAN,

2013). Apesar de relatos de gatos e cães mimetizando essa mesma condição (BAKER; VALLI, 1986; WEISS; AIRD, 2001), no supracitado gato anêmico, não foram evidenciados blastos circulantes e tampouco demais alterações hematológicas compatíveis com RAEB.

Ambos os pacientes apresentavam hiperplasia eritroide reativa, indicando resposta medular. O quadro de hiperplasia eritroide requer no mínimo quatro dias para ocorrer, prazo necessário para a ação da eritropoetina ser eficiente, e é determinado quando há baixa RME em associação com grande quantidade de células eritroides nucleadas no aspirado, em que predominam rubríцитos e metarrubríцитos (HARVEY, 2012b), o que difere do observado pelos autores, em que as células em maior quantidade eram os prorrubríцитos. Essa resposta hiperplásica, associada ao quadro de anemia, possivelmente representa uma doença crônica não expressada clinicamente, que pode incluir desde deficiência de ferro até doenças progressivas dos rins (HARVEY, 2012c; JAIN, 1993a; WEISS; WARDROP, 2010), entretanto, o diagnóstico preciso foi limitado pela metodologia desta pesquisa.

Gatos que apresentaram neutrofilia, por sua vez, demonstraram RME dentro do intervalo de referência, porém, o número médio de neutrófilos segmentados intramedulares estava discretamente elevado quando comparado à referência, passíveis de serem caracterizados como portadores de hiperplasia granulocítica de ordem neutrofílica (HARVEY, 2012b; JAIN, 1993a). Essa alteração pode requerer mais dias para alterar de forma expressiva a RME (HARVEY, 2012b), o que poderia explicar porque os valores se mantiveram dentro do preconizado. Porém, para os autores, a ausência de características clínicas e hematológicas de processos inflamatórios e infecciosos na maior parte dos gatos avaliados, permite questionar se os valores de granulócitos necessários para a implementação do diagnóstico de hiperplasia não são superestimados.

Ademais, não foram observadas alterações no número de precursores de neutrófilos intramedulares e tampouco bastonetes circulantes. Desta forma, associando esses achados hematológicos à condição em que os animais permaneceram desde o transporte até o momento das colheitas de amostras, distantes do seu ambiente natural, compartilhando espaço com pessoas e animais diferentes do habitual, submetidos a alterações climáticas, contenção mecânica e manipulação, acredita-se fortemente que muitos dos casos de neutrofilia estejam associados à resposta hiperaguda ao medo, por efeito de catecolaminas, e ao

estresse (HARVEY, 2012d; PARKS; DAVIS, 2012; VALENCIANO; DECKER; COWELL, 2010).

Além da neutrofilia, a eosinofilia e a basofilia foram achados constante nos pacientes e, obviamente, não podem ser atribuídos integralmente à leucocitose fisiológica. Tal constatação se consolida visto que esses pacientes não foram submetidos à avaliação de carga parasitária ou investigação quanto a existência de doenças alérgicas recentemente controladas, consideradas as principais causas para o aumento de eosinófilos e basófilos circulantes na população estudada (HARVEY, 2012d; JAIN, 1993a; OVINGTON; BEHM, 1997; VALENCIANO; DECKER; COWELL, 2010). Apesar do aumento de eosinófilos e basófilos circulantes, não houve a mesma expressão a partir dos precursores de eosinófilos da medula óssea, mantendo-se em números próximos do considerado ideal.

Estudos descrevem que helmintoses, síndromes autoimunes e doenças alérgicas são as principais promotoras dessas alterações hematológicas, e como consequência ao estímulo das colônias granulocíticas de eosinófilos e basófilos (GC-Eo/B) pela ação da Interleucina 5 (IL-5), pode existir um aumento da celularidade eosinofílica, isso não é frequente (KOURO; TAKATSU, 2009; OVINGTON; BEHM, 1997; WOOD et al., 2002). Tal fato seguramente confirma que, mesmo os animais deste projeto apresentando tais alterações de forma subclínica, a resposta medular não necessariamente irá corresponder ao observado no hemograma, sendo necessária a interpretação conjunta de ambos os resultados, histórico e quadro clínico do paciente.

Nos escassos estudos que expõe numericamente medulas ósseas normais de gatos, nota-se ampla variação quantitativa de precursores eosinofílicos intramedulares, mas a média não costuma ser superior a 3,2% das CNT (GILMORE; GILMORE; JONES, 1964; JAIN, 1993a; TURINELLI; GAVAZZA, 2018). Curiosamente, os gatos sem alterações hematológicas apresentaram um volume maior de precursores eosinofílicos intramedulares, o que induz os autores a questionarem se o intervalo de referência destas células para gatos não é dependente das condições de vida e habitat desses pacientes, induzindo a necessidade fisiológica de maior aporte de eosinófilos.

Essa hipótese é pautada em dados também de outros estudos, um dos quais foi supracitado, em que os autores identificaram o valor máximo de 7% de células da linhagem eosinofílica em um animal considerado como portador de uma medula óssea

dentro dos parâmetros normais (TURINELLI; GAVAZZA, 2018), contradizendo os valores definidos para considerar como uma hiperplasia granulocítica de ordem em eosinófilos (HARVEY, 2012b; WEISS, 2006). Também se questiona a necessidade de desenvolver um olhar mais global para o aspirado medular, não se atendo somente aos dados numéricos, já que muitas vezes podem ser completamente indivíduo-específicos.

A resposta medular em quadros de linfocitose também não foi expressiva em nenhum dos gatos deste projeto. Dos oito animais com essa alteração em leucograma, quatro apresentaram aumento simultâneo de neutrófilos, o que vai de encontro com o que se espera em casos de uma linfocitose por excitação, tal qual citado por diversos autores (HARVEY, 2012d; PARKS; DAVIS, 2012; VALENCIANO; DECKER; COWELL, 2010). Apesar da leucocitose muitas vezes ser um achado inespecífico, pode estar associada também com infecções virais, hemoparasitoses e inflamações discretas ou com certa cronicidade (HARVEY, 2012d; VALENCIANO; DECKER; COWELL, 2010), além de processos neoplásicos como leucemias linfocíticas crônicas (LLC) (LINET et al., 2007; WEISS, 2005a; WORKMAN; VERNAU, 2003).

Um caso em especial chama atenção, onde um gato de 12 meses apresentou 12.658 linfócitos típicos/ μ L, associados com eosinofilia grave e basofilia leve, mas sem alteração nas demais séries de leucócitos ou eritrócitos, e tampouco aumento do número de linfócitos na medula óssea. Alguns autores indicam que quando os linfócitos estão acima de 9.000 linfócitos/ μ L a LLC se torna um diagnóstico palpável, entretanto, outros critérios são necessários para determinar essa condição leucêmica, tais como citopenia de alguma outra linhagem leucocitária e uma medula com mais de 15% das CNT compostas por linfócitos maduros (CAMPBELL; HESS; WILLIAMS, 2013). Apesar da linfocitose desse paciente ser compatível, as demais alterações não permitem determinar o quadro de LLC, além disso, essa neoplasia é comum em paciente idosos, com idade média de 12,5 anos (CAMPBELL; HESS; WILLIAMS, 2013; HARVEY, 2012b; WEISS, 2005b; WORKMAN; VERNAU, 2003), também destoando do presente caso.

Em condições descritas como normais, os linfócitos medulares podem variar de cinco a 21,6% das CNT (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002; JAIN, 1993a; STACY; HARVEY, 2017), o que vai de encontro com os dados encontrados nesta pesquisa. De acordo com a literatura, os linfócitos maduros são facilmente

confundidos com precursores de eritrócitos devido ao tamanho e formato (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002; GRINDEM; TYLER; COWELL, 2007; STACY; HARVEY, 2017). Entretanto, os autores ressaltam a necessidade de se atentar para características citoplasmáticas, em que a principal diferença observada foi relacionada com a coloração mais azul arroxeada opaca e a distribuição uniforme ao redor do núcleo nas células eritroides, em comparação aos linfócitos, com citoplasma escasso e muito pálido, compondo uma meia lua ao redor do núcleo. Ademais, o núcleo das células eritroides tende a ser mais intenso, com cromatina de aspecto mais grumoso, fato já foi descrito por outros autores (MYLONAKIS; HATZIS, 2014).

O número médio de plasmócitos intramedulares de quatro gatos com linfocitose foi superior ao preconizado por Jain (1993a), que institui como normais valores entre 0,2 a 1,6 das CNT. Não obstante, outros autores atestam valores médios inferiores, que variam desde 0,67 até 2% das células nucleadas, com máximo de até 3% de plasmócitos sendo considerados normais (HARVEY, 2012a; MYLONAKIS; HATZIS, 2014; TURINELLI; GAVAZZA, 2018). Números excessivos de plasmócitos intramedulares divergem para dois quadros, a priori, a hiperplasia plasmocítica por doença imuno-mediada o mieloma múltiplo, que devem ser diferenciados principalmente pelos critérios de pleomorfismo: multinucleação, anisocitose e anisocariose (WEISS, 2006), nenhum dos quais foi observado nos plasmócitos dos referidos gatos.

Há também relatos de plasmócitos ocorrendo em maior número em animais com medulas ósseas livres de anormalidades, estes casos foram determinados como hiperplasias plasmocíticas (TURINELLI; GAVAZZA, 2018). O que foi observado no referido estudo é similar ao observado neste trabalho, porém, sabendo que não há um significado clínico específico, especula-se que a utilização do termo hiperplasia plasmocítica seria um fator importante para indução de diagnósticos precipitados e, portanto, optou-se por não os classificar desta forma.

Células de Mott e *Flame cells*, formas reativas de plasmócitos, foram observadas nos animais citados em moderada quantidade, sendo o segundo mais numeroso. As *Flame cells* consistem em plasmócitos maiores que o habitual, com bordos citoplasmáticos internos avermelhados em decorrência do acúmulo de imunoglobulinas ricas em carboidratos, predominantemente IgA (NAIR; GHEITH, 2017; STACY; HARVEY, 2017). Tanto as *Flame cells* quanto as células de Mott já foram observados como componentes primordiais de leucemias em humanos

(PLAZMA; LÖSEMI, 2018), em gamopatias monoglonais (NAIR; GHEITH, 2017) e mielomas em cães e gatos (KIM et al., 2018; YAMADA et al., 2007; ZINKL et al., 1983).

Não é incomum o mieloma ser um achado acidental, não evidenciando alterações clínicas expressivas e com alterações hematológicas pouco significantes (YAMADA et al., 2007), entretanto, a quantidade de plasmócitos intramedulares dos pacientes desse estudo, principalmente os que apresentam *Flame cells*, apesar de estar acima do limiar de referência máximo, ainda parece insuficiente para determinar o diagnóstico de mieloma. Outrossim, ressalta-se como limitação deste estudo, não foram realizadas avaliações bioquímicas ou radiográficas, e tampouco a busca de proteína de *Bence Jones* na urina dos pacientes, que forneceria informações importantes para a exclusão desse diferencial (FLORY; RASSNICK, 2010; RAJKUMAR et al., 2014).

Quanto à avaliação dos monócitos nos esfregaços de medula óssea, ressaltou-se que em todos os grupos os valores foram superiores aos preconizados pelo intervalo de referência (JAIN, 1993a) e aos valores obtidos também foram superiores aos encontrados por outros autores (TURINELLI; GAVAZZA, 2018). Entretanto, a quantidade de monócitos que compõe a CNT medular normal ainda é passível de dúvidas, já que existem referências indicando valores iguais ou inferiores a 2% como normais, e outros relatando normalidade com até 5% das CNT. É importante ressaltar que a contagem total de monócitos costuma ser realizada a partir de células maduras, já que as imaturas são virtualmente indistintas dos metamielócitos (GRINDEM, 1989).

Também não foram observadas alterações na celularidade da medula óssea em responsividade à leucopenia por linfopenia em dois pacientes, a exceção do discreto aumento no número de mieloblastos e da redução do número de neutrófilos segmentados. Tem-se como principais causas de leucopenia por linfopenia em gatos os vírus FeLV e FIV (DA COSTA et al., 2017; HARTMANN, 2011; STÜTZER et al., 2010), porém os animais deste trabalho foram previamente testados e se apresentavam negativos para ambos os vírus. Outra causa de relevância em gatos é a infecção pelo vírus da Panleucopenia Felina, entretanto essas infecções costumam ter um quadro clínico muito agressivo, com baixo índice de sobrevivência (KRUSE et al., 2010), o que permite também excluir esse diferencial.

A medula óssea pode responder ao quadro de leucopenia, apresentando uma hiperplasia granulocítica, ou simplesmente não apresentar nenhuma alteração, tal como já observado previamente (TURINELLI; GAVAZZA, 2018), e semelhante ao

observado neste trabalho. Notou-se que houve um discreto aumento do *poll* de células precursoras mitóticas da série branca, especificamente mieloblastos, porém em proporções que não permitem indicar uma resposta medular eficiente, e merece atenção o fato dos neutrófilos bastonetes intramedulares estarem discretamente reduzidos de acordo com o predito por Jain (1993a), mas ausentes na circulação periférica, tornando pouco provável um quadro inflamatório crônico.

O mesmo se discute para os 17 gatos que apresentaram linfopenia isolada, sem redução nas demais células circulantes. Denota-se que inúmeras causas, além dos agentes virais, podem estar associadas com o quadro de linfopenia isolada, como a ruptura de ductos linfáticos eferentes, processos neoplásicos que alteram a estrutura dos órgãos linfáticos, e pelo efeito de drogas imunossupressoras como os corticosteroides (DUA et al., 1994; HARVEY, 2012d; SPARKES et al., 1993; VALENCIANO; DECKER; COWELL, 2010). Entretanto, nenhum dos gatos apresentou alterações clínicas ou históricos que fundamentassem essas causas, excluindo a maior parte desses diagnósticos diferenciais. Uma exceção deve ser realizada para as infecções virais, visto que neste trabalho, os animais foram testados somente para FeLV e FIV.

Tais pacientes tiveram menor número de linfócitos intramedulares de acordo com a referência preconizada (JAIN, 1993a), porém, outros pesquisadores consideraram normais medulas em que o número de linfócitos partia de 1,5% até 28,5% (TURINELLI; GAVAZZA, 2018), outros de 5% a 20% (GRINDEM; NEEL; JUOPPERI, 2002), o que nos faz questionar se os dados obtidos nesta pesquisa de fato refletem na condição linfopênica dos pacientes.

5.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a avaliação quantitativa da medula óssea muitas vezes se mostrou distinta do que a referência mais utilizada atualmente preconiza, e que isso pode estar associado a inúmeros fatores intrínsecos ao paciente, por questões individuais, e até mesmo ao ambiente e a forma na qual vivem. Ademais, ressalta-se que as alterações observadas nos exames hematológicos podem ser expressadas de forma sutil pela medula óssea em gatos, sendo necessária uma interpretação adequada, pautada na avaliação conjunta dos dados clínicos, epidemiológicos, hematológicos e medulares.

5.6 REFERÊNCIAS

AMBROSI, T. H.; SCIALDONE, A.; GRAJA, A.; GOHLKE, S.; JANK, A. M.; BOCIAN, C.; WOELK, L.; FAN, H.; LOGAN, D. W.; SCHÜRMANN, A.; SARAIVA, L. R.; SCHULZ, T. J. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 771- 784.e6, 2017.

BAKER, R. J.; VALLI, V. E. O. Dysmyelopoiesis in the cat: A hematological disorder resembling refractory anemia with excess blasts in man. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 3–6, 1986.

BOLLIGER, A. P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: Indications, methods, and normal morphology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 2, p. 58–67, 2004.

BREUER, W.; STAHR, K.; MAJZOUB, M.; HERMANN, W. Bone-Marrow Changes in Infectious Diseases and Lymphohaemopoietic Neoplasias in Dogs and Cats — a Retrospective Study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 57–66, 1998.

BYERS, C. G. Diagnostic bone marrow sampling in cats: Currently accepted best practices. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 7, p. 759–767, 2017.

CAMPBELL, M. W.; HESS, P. R.; WILLIAMS, L. E. Chronic lymphocytic leukaemia in the cat: 18 cases (2000-2010). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 4, p. 256–264, 2013.

CARTER, C. M.; CREGAR, L. C.; AULBACH, A. D. Cytological Bone Marrow Cell Differential Counts and Morphologic Findings in Healthy Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) from Nonclinical Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 2, p. 267–274, 2017.

CUNIN, P.; NIGROVIC, P. A. Megakaryocyte emperipoiesis: a new frontier in cell-in-cell interaction. **Platelets**, v. 31, n. 6, p. 700–706, 2020.

COSTA, F. V. A.; VALLE, S. de F.; MACHADO, G.; CORBELLINI, L. G.; COELHO, E. M.; ROSA, R. B.; GONZÁLEZ, F. H. D. 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, p. 1531–1536, 2017.

DUA, N.; REUBEL, G.; MOORE, P. F.; HIGGINS, J.; PEDERSEN, N. C. An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 4, p. 337–355, 1994.

FLORY, A. B.; RASSNICK, K. M. Multiple myeloma and plasma cell tumors. In: COTE, E. (Ed.). **Clinical Veterinary Advisor: Dogs and Cats**. 2. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2010. p. 730–732.

GILMORE, C. E.; GILMORE, V. H.; JONES, T. C. Bone Marrow and Peripheral Blood of Cats: Technique and Normal Values. **Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 1964.

GRINDEM, C. B. Bone marrow biopsy and evaluation. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 19, n. 4, p. 669–696, 1989.

GRINDEM, C. B.; NEEL, J. A.; JUOPPERI, T. A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1313–1374, 2002.

GRINDEM, C. B.; TYLER, R. D.; COWELL, R. L. The Bone Marrow. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. (Eds.). **Diagnostic Cytology And Hematology Of The Dog And Cat**. 3. ed. Edinburgh, UK: Elsevier Health Sciences, 2007. p. 422–450.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3–4, p. 190–201, 2011.

HARVEY, J. W. Bone Marrow Examination. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. a. p. 234–259.

HARVEY, J. W. Disorders of Bone Marrow. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. b. p. 267–327.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. c.

HARVEY, J. W. Evaluation of Leukocytic Disorders. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. d. p. 122–17.

HISASUE, M.; NAGASHIMA, N.; NISHIGAKI, K.; FUKUZAWA, I.; URA, S.; KATAE, H.; TSUCHIYA, R.; YAMADA, T.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 5, p. 1133–1141, 2009.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, 1993. a.

JAIN, N. C. Classification of myeloproliferative disorders in cats using criteria proposed by the animal leukaemia study group: A retrospective study of 181 cases (1969-1992). **Comparative Haematology International**, v. 3, n. 3, p. 125–134, 1993. b.

JAIN, N. C.; BLUE, J. T.; GRINDEM, C. B.; HARVEY, J. W.; KOCIBA, G. J.; KREHBIEL, J. D.; LATIMER, K. S.; RASKIN, R. E.; THRALL, M. a.; ZINKL, J. G. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. **Veterinary clinical pathology**, v. 20, n. 3, p. 63–82, 1991.

KANAGASABAPATHY, D.; BLOSSER, R. J.; MAUPIN, K. A.; HONG, J. M.; ALVAREZ, M.; GHOSH, J.; MOHAMAD, S. F.; AGUILAR-PEREZ, A.; SROUR, E. F.; KACENA, M. A.; BRUZZANITI, A. Megakaryocytes promote osteoclastogenesis in aging. **Aging**, v. 12, n. 14, p. 15121–15133, 2020.

KIM, S.; SON, E.; LEE, S.; LEE, S.; KIM, H.; KANG, M.; LEE, C.; PARK, H. Multiple myeloma associated with IgA lambda gammopathy and multiple myeloma oncogene 1 in a Yorkshire terrier. **Veterinarni Medicina**, v. 2018, n. 2016, p. 187–192, 2018.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. **International Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1303–1309, 2009.

KRUSE, B. D.; UNTERER, S.; HORLACHER, K.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. **Journal of veterinary internal medicine**, United States, v. 24, n. 6, p. 1271–1276, 2010.

LACERDA, L. C.; SILVA, A. N.; FREITAS, J. S.; CRUZ, R. D. S.; SAID, R. A.; MUNHOZ, A. D. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-8, 2017.

LEE, K. P. Emperipolesis of Hematopoietic Cells within Megakaryocytes in Bone Marrow of the Rat. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 6, p. 473–478, 1989.

LICHTMAN, M. A. Does a Diagnosis of Myelogenous Leukemia Require 20% Marrow Myeloblasts, and Does <5% Marrow Myeloblasts Represent a Remission? The History and Ambiguity of Arbitrary Diagnostic Boundaries in the Understanding of Myelodysplasia. **The Oncologist**, v. 18, n. 9, p. 973–980, 2013.

LINET, M. S.; SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; WEISENBURGER, D. D.; RICHARDSON, D. B.; LANDGREN, O.; BLAIR, A.; SILVER, S.; FIELD, R. W.; CALDWELL, G.; HATCH, M.; DORES, G. M. Chronic lymphocytic leukaemia: An overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 5, p. 672–686, 2007.

MENAGH, P. J.; TURNER, R. T.; JUMP, D. B.; WONG, C. P.; LOWRY, M. B.; YAKAR, S.; ROSEN, C. J.; IWANIEC, U. T. Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 757–768, 2010.

MYLONAKIS, M. E.; HATZIS, A. Practical bone marrow cytology in the dog and cat. **The Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 65, n. 3, p. 181–196, 2014.

MUSCHLER, G. F.; NITTO, H.; BOEHM, C. A.; EASLEY, K. A. Age- and Gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, v. 2001, p. 117–125, 2001.

NAIR, R.; GHEITH, S. Flame cell in IgA monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Blood (Images In Hematology)**, v. 129, n. 10, p. 1402, 2017.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. A. The Enigmatic Eosinophil: Investigation of the Biological Role of Eosinophils in Parasitic Helmint Infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92 SUPPL., September, p. 93–104, 1997.

PARKS, K. R.; DAVIS, J. M. Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. **Surgical Infections**, v. 13, n. 5, p. 300–306, 2012.

PLAZMA, A.; LÖSEMI, H. Flaming Plasma Cell Leukemia. **Turkish Journal of Hematology**, v. 35, n. 2, p. 134, 2018.

RAJKUMAR, S. V.; DIMOPOULOS, M. A.; PALUMBO, A.; BLADE, J.; MERLINI, G.; MATEOS, M.; KUMAR, S.; HILLEGASS, J.; KASTRITIS, E.; RICHARDSON, P.; LANDGREN, O.; PAIVA, B.; DISPENZIERI, A.; WEISS, B.; LELEU, X.; ZWEEGMAN, S.; LONIAL, S.; ROSINOL, L.; ZAMAGNI, E.; JAGANNATH, S.; SEZER, O.; KRISTINSSON, S. Y.; CAERS, J.; USMANI, S. Z.; LAHUERTA, J. J.; JOHNSON, H. E.; BEKSAC, M.; CAVO, M.; GOLDSCHMIDT, H.; TERPOS, E.; KYLE, R. A.; ANDERSON, K. C.; DURIE, B. G. M.; MIGUEL, J. F. S. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **Lancet Oncology**, v. 15, n. 12, p. e538–e548, 2014.

RASKIN, R. E.; MESSICK, J. B. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 23–42, 2012.

RASTOGI, V.; SHARMA, R.; MISRA, S. R.; YADAV, L.; SHARMA, V. Emperipolesis - A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. ZM01–ZM02, 2014.

SABLE, M.; SEHGAL, K.; GADAGE, V.; SUBRAMANIAN, P.; GUJRAL, S. Megakaryocytic emperipolesis: A histological finding in myelodysplastic syndrome. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 599–600, 2009.

SILVA, R. G. Da; COSTA, M. J. R. P. Da; SOBRINHO, A. G. S. Influence of hot environments on some blood variables of sheep. **International Journal of Biometeorology**, v. 3, p. 223–225, 1992.

SPARKES, A. H.; HOPPER, C. D.; MILLARD, W. G.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline Immunodeficiency Virus Infection Clinicopathologic Findings in 90 Naturally Occurring Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 85–90, 1993.

STACY, N. I.; HARVEY, J. W. Bone Marrow Aspirate Evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 47, n. 1, p. 31–52, 2017.

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. 192–7, 2010.

TAVASSOLI, M. Modulation of megakaryocyte emperipolesis by phlebotomy: megakaryocytes as a component of marrow-blood barrier. **Blood cells**, v. 12 1, p. 205–216, 1986.

TOTH, S. R.; ONIONS, D. E.; JARRETT, O. Histopathological and Hematological Findings in Myeloid Leukemia Induced by a New Feline Leukemia Virus Isolate. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 4, p. 462–470, 1986.

TURINELLI, V.; GAVAZZA, A. Retrospective study of 152 feline cytological bone marrow examinations: preliminary classification and ranges. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 12, p. 1158–1168, 2018.

VALENCIANO, A. C.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L. Interpretation of Feline Leukocyte Responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 335–344.

VICENTE SOBRINHO, L. S.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; ROSSI, C. N.; MARCONDES, M. Serofrequency of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats of Araçatuba, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 378–383, 2011.

VOGT, A. H.; RODAN, I.; BROWN, M.; BROWN, S.; FORMAN, M. J. L.; NEILSON, J.; SPARKES, A. AAFP – AAHA Feline Life Stage Guidelines Background and Goals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, p. 70–85, 2010.

WEISS, D. J. Differentiating benign and malignant causes of lymphocytosis in feline bone marrow. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 6, p. 855–859, 2005. a.

WEISS, D. J. A retrospective study of the incidence and classification of bone marrow disorder in cats (1996-2004). **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, n. 4, p. 179–185, 2006.

WEISS, D. J.; AIRD, B. Cytologic Evaluation of Primary and Secondary Myelodysplastic Syndromes in the Dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 2, p. 67–75, 2001.

WEISS, D.; WARDROP, K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010.

WOOD, L. J.; SEHMI, R.; DORMAN, S.; HAMID, Q.; TULIC, M. K.; WATSON, R. M.; FOLEY, R.; WASI, P.; DENBURG, J. A.; GAUVREAU, G.; O'BYRNE, P. M. Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin-5 expression in subjects with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 6, p. 883–889, 2002.

WORKMAN, H. C.; VERNAU, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: The veterinary perspective. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1379–1399, 2003.

YAMADA, O.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; ISOTANI, M.; AZAKAMI, M.; SAWADA, S.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Light-chain multiple myeloma in a cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 443–447, 2007.

ZINKL, J. G.; LECOUEUR, R. A.; DAVIS, D. C.; SAUNDERS, G. K. "Flaming" Plasma Cells in a Dog with IgA Multiple Myeloma. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, n. 3, p. 15–19, 1983.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A positividade para FeLV e FIV foi semelhante à observada previamente em gatos da mesma região de estudo, com base nos resultados de todas as técnicas utilizadas para diagnóstico. Todas as técnicas se mostraram eficientes para detecção viral, e a associação dos seus resultados favorece a determinação do curso clínico da infecção.
- O teste com maior número de gatos positivos para FeLV foi a PCR, seguida então pela ICQ, e só então pelo ELISA, o que demonstra que a ICQ teve resultados promissores para o diagnóstico da infecção se comparada às técnicas já estabelecidas, e abrange gatos nas fases progressivas e regressivas da infecção.
- Para FIV, a ICQ demonstrou maior eficiência diagnóstica que o ELISA, o que indica que a técnica desenvolvida possui uma capacidade superior de detectar a infecção.
- A utilização da técnica de ICQ em pesquisas tende a ser válida, principalmente no tocante à identificação das células alvo-específicas dos agentes virais na medula óssea.
- A avaliação quantitativa da medula óssea muitas vezes se mostrou distinta do que a referência mais utilizada atualmente preconiza, fato que pode estar associado com inúmeros fatores intrínsecos ao paciente, por questões individuais, e até mesmo ao ambiente e a forma na qual vivem.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-PIRBAZARI, M.; JAMSHIDI, S., NASSIRI, S. M., ZAMANI-AHMADMAHMUDI, M. Comparative measurement of FeLV load in hemolymphatic tissues of cats with hematologic cytopenias. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2019.
- ALMEIDA, N. R. De; DANELLI, M. G. M. M.; DA SILVA, L. H. P. P.; HAGIWARA, M. K.; MAZUR, C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 8, p. 583–586, 2012.
- ALMEIDA, I. O.; SILVA, M. A. A.; SENA, B. V.; PAZ, J. S.; JARETTA, T. A.; FARIA, P. C. G.; HORTA, R. S. Estudo retrospectivo de retrovírus por teste imunoenzimático em gatos na Grande Vitória (ES, Brasil) e neoplasias associadas. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e114220-e114220, 2021.
- AMBROSI, T. H.; SCIALDONE, A.; GRAJA, A.; GOHLKE, S.; JANK, A. M.; BOCIAN, C.; WOELK, L.; FAN, H.; LOGAN, D. W.; SCHÜRMANN, A.; SARAIVA, L. R.; SCHULZ, T. J. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 771- 784.e6, 2017.
- ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOMÉNECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V. M.; TOURAL, C.; MARTÍN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 1, p. 14–22, 2007.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. 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.
- AVRAMEAS, A.; GUILLET, J. G.; CHOUCANE, L.; MORAILLON, A.; SONIGO, P.; STROSBERG, A. D. Localisation of three epitopes of the ENV protein of feline immunodeficiency virus. **Molecular Immunology**, v. 29, n. 5, p. 565–572, 1992.
- BAKER, R. J.; VALLI, V. E. O. Dysmyelopoiesis in the cat: A hematological disorder resembling refractory anemia with excess blasts in man. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 3–6, 1986.
- BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; SAPIAN, N. A.; RAHMAN, N. A.; ALAZAWY, A. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.
- BANDECCHI, P.; DELL'OMODARME, M.; MAGI, M.; PALAMIDESSI, A.; PRATI, M. C. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. **Veterinary Record**, v. 158, n. 16, p. 555–557, 2006.

BARR, M. FIV, FeLV and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, p. 144–153, 1996.

BEALL, M. J.; BUCH, J.; CAHILL, R. J.; CLARK, G.; HANSCOM, J.; ESTRADA, M.; LEUTENEGGER, C. M.; CHANDRASHEKAR, R. Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 67, August, p. 101348, 2019.

BEEBE, A. M.; GLUCKSTERN, T. G.; GEORGE, J.; PEDERSEN, N. C.; DANDEKAR, S. Detection of feline immunodeficiency virus infection in bone marrow of cats. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 37-49, 1992.

BIEZUS, G.; FERIAN, P. E.; PEREIRA, L. H. H. S.; WITHOEFT, J. A.; ANTUNES, M. M.; XAVIER, M. G. N.; VOLPATO, J.; CRISTO, T. G.; FONTEQUE, J. H.; CASAGRANDE, R. A. Clinical and Haematological Disorders in Cats with Natural and Progressive Infection by Feline Leukemia Virus (FeLV). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 0, p. 1–9, 2019. a.

BIEZUS, G.; MACHADO, G.; FERIAN, P. E.; COSTA, U. M.; PEREIRA, L. H. H. da S.; WITHOEFT, J. A.; NUNES, I. A. C.; MULLER, T. R.; CRISTO, T. G.; CASAGRANDE, R. A. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, June, p. 17–21, 2019. b.

BOLLIGER, A. P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: Indications, methods, and normal morphology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 2, p. 58–67, 2004.

BREUER, W.; STAHR, K.; MAJZOUB, M.; HERMANN, W. Bone-Marrow Changes in Infectious Diseases and Lymphohaemopoietic Neoplasias in Dogs and Cats — a Retrospective Study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 119, p. 57–66, 1998.

BUDKA, H.; COSTANZI, G.; CRISTINA, S.; LECHI, A.; PARRAVICINI, C.; TRABATTONI, R.; VAGO, L. Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV) - A histological, immunocytochemical, and electron microscopical study of 100 autopsy cases. **Acta Neuropathologica**, v. 75, n. 2, p. 185–198, 1987.

BURLING, A. N.; LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; CRANDALL, M. M.; TUCKER, S. J.; WOOD, E. G.; FOSTER, J. D. Seroprevalences of Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus Infection in Cats in the United States and Canada and Risk Factors for Seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 2, p. 187–194, 2017.

BYERS, C. G. Diagnostic bone marrow sampling in cats: Currently accepted best practices. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 7, p. 759–767, 2017.

CALZOLARI, M.; YOUNG, E.; COX, D.; DAVIS, D.; LUTZ, H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1–2, p. 83–92, 1995.

CAMPBELL, M. W.; HESS, P. R.; WILLIAMS, L. E. Chronic lymphocytic leukaemia in the cat: 18 cases (2000-2010). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 4, p. 256–264, 2013.

CARTER, C. M.; CREGAR, L. C.; AULBACH, A. D. Cytological Bone Marrow Cell Differential Counts and Morphologic Findings in Healthy Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) from Nonclinical Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 2, p. 267–274, 2017.

CHHETRI, B. K.; BERKE, O.; PEARL, D. L.; BIENZLE, D. Comparison of risk factors for seropositivity to feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats: A case-case study. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.

CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F.; PEREIRA, L. H. H. S. H. S.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V.; COSTA, L. S.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 20–28, 2019. a.

CRISTO, T. G. G.; BIEZUS, G.; NORONHA, L. F. F.; GASPAR, T.; DAL PONT, T. P. P.; WITHOEFT, J. A.; FURLAN, L. V. V.; COSTA, L. S. S.; TRAVERSO, S. D. D.; CASAGRANDE, R. A.A. Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v.170, p.10–21, 2019. b.

CUNIN, P.; NIGROVIC, P. A. Megakaryocyte emperipolesis: a new frontier in cell-in-cell interaction. **Platelets**, v. 31, n. 6, p. 700–706, 2020.

DA COSTA, F. V. A.; VALLE, S. F.; MACHADO, G.; CORBELLINI, L. G.; COELHO, E. M.; ROSA, R. B.; GONZÁLEZ, F. H. D. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1531–1536, 2017.

DAY, M. J.; CRAWFORD, C.; MARCONDES, M.; MURDOCH, U.; PAULISTA, U. E.; COOK, U. J.; EXECUTIVO, R. Recomendações sobre a vacinação para médicos veterinários de pequenos animais da América Latina: Grupo de Diretrizes de Vacinação da WSAVA. **Journal of Small Animal Practice**, p. 1–39, 2020.

DUA, N.; REUBEL, G.; MOORE, P. F.; HIGGINS, J.; PEDERSEN, N. C. An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 4, p. 337–355, 1994.

ENGLERT, T.; LUTZ, H.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 392–398, 2012.

FLORY, A. B.; RASSNICK, K. M. Multiple myeloma and plasma cell tumors. In: COTE, E. (Ed.). **Clinical Veterinary Advisor: Dogs and Cats**. 2. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2010. p. 730–732.

FRANKENFELD, J.; MEILI, T.; MELI, M. L.; RIOND, B.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K.; BÖNZLI, E.; PINEROLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R. Decreased sensitivity of the serological detection of feline immunodeficiency virus infection potentially due to imported genetic variants. **Viruses**, v. 11, n. 8, 2019.

FROMONT, E.; PONTIER, D.; LANGLAIS, M. Dynamics of a feline retrovirus (FeLV) in host populations with variable spatial structure. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1401, p. 1097–1104, 1998.

GAGNON, A. C.; LANGLADE, C.; BUFF, S.; ROSSET, E. A retrospective internet-based survey of French cat breeders about early-age neutering. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 6, p. 514–520, 2020.

GATES, M. C.; VIGEANT, S.; DALE, A. Prevalence and risk factors for cats testing positive for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in cats entering an animal shelter in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, n. 6, p. 285–291, 2017.

GILMORE, C. E.; GILMORE, V. H.; JONES, T. C. Bone Marrow and Peripheral Blood of Cats: Technique and Normal Values. **Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 1964.

GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 12, p. 985–992, 2009.

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

GRINDEM, C. B. Bone marrow biopsy and evaluation. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 19, n. 4, p. 669–696, 1989.

GRINDEM, C. B.; NEEL, J. A.; JUOPPERI, T. A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1313–1374, 2002.

GRINDEM, C. B.; TYLER, R. D.; COWELL, R. L. The Bone Marrow. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA, D. B. (Eds.). **Diagnostic Cytology And Hematology Of The Dog And Cat**. 3. ed. Edinburgh, UK: Elsevier Health Sciences, 2007. p. 422–450.

HAGIWARA, M. K.; RECHE Jr., A.; LUCAS, S. R. R. Clinical studies of feline leukemia virus infection among cats in São Paulo, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 4, p. 35–38, 1997.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3–4, p. 190–201, 2011.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. a. p. 108–136.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684–2710, 2012. b.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C. E.; VIDYASHANKAR, A. N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H. F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 6, p. 439–445, 2007.

HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, n. 5, p. 1013–1036, 2020.

HARVEY, J. W. Bone Marrow Examination. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. a. p. 234–259.

HARVEY, J. W. Disorders of Bone Marrow. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. b. p. 267–327.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1. ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. c.

HARVEY, J. W. Evaluation of Leukocytic Disorders. In: HARVEY, J. W. (Ed.). **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. Saint Louis, Missouri: Saunders, 2012. d. p. 122–17.

HISASUE, M.; NAGASHIMA, N.; NISHIGAKI, K.; FUKUZAWA, I.; URA, S.; KATAE, H.; TSUCHIYA, R.; YAMADA, T.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in cats infected with feline leukemia virus clone33 containing a unique long terminal repeat. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 5, p. 1133–1141, 2009.

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

HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J. B.; GRUBER S; BORETTI, F.; SIGRIST, B.; LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 7, p. 1589–1596, 2001.

JACKSON, M. L.; HAINES, D. M.; TAYLOR, S. M.; MISRA, V. Feline leukemia virus detection by ELISA and PCR in peripheral blood from 68 cats with high, moderate, or low suspicion of having FeLV-related disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 1996. a.

JACKSON, M. L.; WOOD, S. L.; MISRA, V.; HAINES, D. M. Immunohistochemical identification of B and T lymphocytes in formalin-fixed, paraffin-embedded feline lymphosarcomas: Relation to feline leukemia virus status, tumor site, and patient age. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 3, p. 199–204, 1996. b.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia, PA: Lea and Febiger, 1993. a.

JAIN, N. C. Classification of myeloproliferative disorders in cats using criteria proposed by the animal leukaemia study group: A retrospective study of 181 cases (1969-1992). **Comparative Haematology International**, v. 3, n. 3, p. 125–134, 1993. b.

JAIN, N. C.; BLUE, J. T.; GRINDEM, C. B.; HARVEY, J. W.; KOCIBA, G. J.; KREHBIEL, J. D.; LATIMER, K. S.; RASKIN, R. E.; THRALL, M. a.; ZINKL, J. G. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. **Veterinary clinical pathology**, v. 20, n. 3, p. 63–82, 1991.

KANAGASABAPATHY, D.; BLOSSER, R. J.; MAUPIN, K. A.; HONG, J. M.; ALVAREZ, M.; GHOSH, J.; MOHAMAD, S. F.; AGUILAR-PEREZ, A.; SROUR, E. F.; KACENA, M. A.; BRUZZANITI, A. Megakaryocytes promote osteoclastogenesis in aging. **Aging**, v. 12, n. 14, p. 15121–15133, 2020.

KEYDAR, I.; OHNO, T.; NAYAK, R.; SWEET, R.; SIMONI, F.; WEISS, F.; KARBY, S.; MESA-TEJADA, R.; SPIEGELMAN, S. Properties of retrovirus-like particles produced by a human breast carcinoma cell line: Immunological relationship with mouse mammary tumor virus proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13 I, p. 4188–4192, 1984.

KIM, S.; SON, E.; LEE, S.; LEE, S.; KIM, H.; KANG, M.; LEE, C.; PARK, H. Multiple myeloma associated with IgA lambda gammopathy and multiple myeloma oncogene 1 in a Yorkshire terrier. **Veterinarni Medicina**, v. 2018, n. 2016, p. 187–192, 2018.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. **International Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1303–1309, 2009.

KRUSE, B. D.; UNTERER, S.; HORLACHER, K.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Prognostic factors in cats with feline panleukopenia. **Journal of veterinary internal medicine**, United States, v. 24, n. 6, p. 1271–1276, 2010.

LEE, K. P. Emperipolesis of Hematopoietic Cells within Megakaryocytes in Bone Marrow of the Rat. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 6, p. 473–478, 1989.

LEITE-FILHO, R. V.; PANZIERA, W.; BANDINELLI, M. B.; HENKER, L. C.; DA CONCEIÇÃO MONTEIRO, K.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P. Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. **Veterinary and Comparative Oncology**, April, p. 1–7, 2019.

LEONARDO, E.; BARDALES, R. H. H. **Practical immunocytochemistry in diagnostic cytology**. 1. ed. Cham, Suíça: Springer Nature Switzerland, 2020.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E.; THAYER, V.; LEVY, J.; CRAWFORD, C.; THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 3, p. 300–316, 2008.

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 10, p. 1558–1561, 2004.

LEVY, J. K.; EDINBORO, C. H. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, feline leukemia virus, and feline immunodeficiency virus infection among dogs and cats exported from the 2005 Gulf Coast hurricane disaster area. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 3, p. 371–376, 2006.

LEVY, L. S. Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 14–22, 2008.

LICHTMAN, M. A. Does a Diagnosis of Myelogenous Leukemia Require 20% Marrow Myeloblasts, and Does <5% Marrow Myeloblasts Represent a Remission? The History and Ambiguity of Arbitrary Diagnostic Boundaries in the Understanding of Myelodysplasia. **The Oncologist**, v. 18, n. 9, p. 973–980, 2013.

LINET, M. S.; SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; WEISENBURGER, D. D.; RICHARDSON, D. B.; LANDGREN, O.; BLAIR, A.; SILVER, S.; FIELD, R. W.; CALDWELL, G.; HATCH, M.; DORES, G. M. Chronic lymphocytic leukaemia: An overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 5, p. 672–686, 2007.

LITTLE, S.; LEVY, J.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOSIE, M.; OLAH, G.; DENIS, K. S. 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 1, p. 5–30, 2020.

LIU, J.; O'CONNOR, T.; BEALL, M.; CHANDRASHEKAR, R.; LAPPIN, M. Evaluation of rapid diagnostic test kits for feline leukemia virus infection using samples from naturally infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 2, n. 2, p. 1–4, 2016.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287–296, 2004.

MENAGH, P. J.; TURNER, R. T.; JUMP, D. B.; WONG, C. P.; LOWRY, M. B.; YAKAR, S.; ROSEN, C. J.; IWANIEC, U. T. Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 757–768, 2010.

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

MÖSTL, K.; ADDIE, D. D.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Something old, something new: Update of the 2009 and 2013 ABCD guidelines on prevention and management of feline infectious diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 7, p. 570–582, 2015.

MUSCHLER, G. F.; NITTO, H.; BOEHM, C. A.; EASLEY, K. A. Age- and Gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 19, v. 2001, p. 117–125, 2001.

MYLONAKIS, M. E.; HATZIS, A. Practical bone marrow cytology in the dog and cat. **The Journal of Hellenic Veterinary Medical Society**, v.65, n.3, p. 181–196, 2014.

NAIR, R.; GHEITH, S. Flame cell in IgA monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Blood (Images In Hematology)**, v. 129, n. 10, p. 1402, 2017.

OBERT, L. A.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus clade C mucosal transmission and disease courses. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, n. 7, p. 677–688, 2000.

OLIVEIRA REIS, M.; MELLO, L. S.; HESSE, K. L.; LORENZETT, M. P.; REIS, K. D. H. L.; CAMPOS, F. S.; ROEHE, P. M.; PAVARINI, S. P. Ostecondroma em um felino jovem infectado pelo vírus da leucemia felina. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 1, p. 2015–2018, 2017.

ORTEGA-PACHECO, A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; COLIN-FLORES, R. F.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; GUZMAN-MARIN, E.; JIMENEZ-COELLO, M. Seroprevalence of feline leukemia virus, feline immunodeficiency virus and heartworm infection among owned cats in tropical Mexico. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 460–464, 2014.

ORTEGA, C.; VALENCIA, A. C.; DUQUE-VALENCIA, J.; RUIZ-SAENZ, J. Prevalence and genomic diversity of feline leukemia virus in privately owned and shelter cats in Aburrá Valley, Colombia. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2020.

OSAMURA, R. Y. Applications of immunocytochemistry to diagnostic cytopathology. **Diagnostic Cytopathology**, v. 5, n. 1, p. 55–63, 1989.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. A. The Enigmatic Eosinophil: Investigation of the Biological Role of Eosinophils in Parasitic Helminth Infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92 SUPPL., September, p. 93–104, 1997.

ÖZKUL, AYKUT; YEŞİLBAĞ, KADİR; BURGU, İBRAHİM. Comparison of four diagnostic techniques for detecting bovine virus diarrhea virus (BVDV) in buffy coat samples after long-term storage. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 26, n. 5, p. 1043-1048, 2002.

PARKS, K. R.; DAVIS, J. M. Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. **Surgical Infections**, v. 13, n. 5, p. 300–306, 2012.

PATARAPADUNGKIT, N.; KHONHAN, P.; PISUTTIMARN, P.; PIENTONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; KOONMEE, S. Human papillomavirus detection and abnormal anal cytology in HIV-infected patients using p16/Ki-67 dual-staining. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 7, p. 2013–2019, 2020.

PENA, H. F. de J.; EVANGELISTA, C. M.; CASAGRANDE, R. A.; BIEZUS, G.; WISSER, C. S.; FERIAN, P. E.; MOURA, A. B. De; ROLIM, V. M.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B. F.; GENNARI, S. M.; TRAVERSO, S. D. Fatal toxoplasmosis in an immunosuppressed domestic cat from Brazil caused by *Toxoplasma gondii* clonal type I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 2, p. 177–184, 2017.

PEREIRA, P. R.; TAGLIARI, N. Jr.; LEITE-FILHO, R. V.; SCHAEFER, G. C.; COSTA, F. V. A.; PAVARINI, S. P. Ganglioneuroblastoma de nervo facial em um gato infectado pelo vírus da leucemia felina. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

PERMAN, V.; OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B. Bone Marrow Biopsy. **The Veterinary clinics of North America**, v. 4, n. 2, p. 293–310, 1974.

PLAZMA, A.; LÖSEMI, H. Flaming Plasma Cell Leukemia. **Turkish Journal of Hematology**, v. 35, n. 2, p. 134, 2018.

RAJKUMAR, S. V.; DIMOPOULOS, M. A.; PALUMBO, A.; BLADE, J.; MERLINI, G.; MATEOS, M.; KUMAR, S.; HILLEGASS, J.; KASTRITIS, E.; RICHARDSON, P.; LANDGREN, O.; PAIVA, B.; DISPENZIERI, A.; WEISS, B.; LELEU, X.; ZWEEGMAN, S.; LONIAL, S.; ROSINOL, L.; ZAMAGNI, E.; JAGANNATH, S.; SEZER, O.; KRISTINSSON, S. Y.; CAERS, J.; USMANI, S. Z.; LAHUERTA, J. J.; JOHNSON, H. E.; BEKSAC, M.; CAVO, M.; GOLDSCHMIDT, H.; TERPOS, E.; KYLE, R. A.; ANDERSON, K. C.; DURIE, B. G. M.; MIGUEL, J. F. S. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **Lancet Oncology**, v. 15, n. 12, p. e538–e548, 2014.

RASKIN, R. E.; MESSICK, J. B. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 23–42, 2012.

RASTOGI, V.; SHARMA, R.; MISRA, S. R.; YADAV, L.; SHARMA, V. Emperipolesis - A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 12, p. ZM01–ZM02, 2014.

RAVI, M.; WOBESER, G. A.; TAYLOR, S. M.; JACKSON, M. L. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and survival analysis. **The Canadian veterinary journal**, v. 51, p. 271–276, 2010.

ROBBINS, H. J.; CASEY, R. A.; CLEMENTS, J.; GRUFFYDD-JONES, T.; MURRAY, J. K. Assessing the impact of a regional UK feline neutering campaign. **Veterinary Record**, v. 182, n. 10, p. 291–291, 2018.

SABLE, M.; SEHGAL, K.; GADAGE, V.; SUBRAMANIAN, P.; GUJRAL, S. Megakaryocytic emperipolesis: A histological finding in myelodysplastic syndrome. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 599–600, 2009.

SANTANGELO, K. S.; SCHAEFER, D. M. W.; LEAVELL, S. E.; PRIEST, H. L. Special Staining Techniques: Application and Quality Assurance. In: SHARKEY, L. C.; RADIN, M. J.; SEELI, D. (Eds.). **Veterinary Cytology**. 1th. ed. Hoboken, Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2021. p. 47–72.

SCHRENZEL, M. D.; HIGGINS, R. J.; HINRICHS, S. H.; SMITH, M. O.; TORTEN, M. Type C retroviral expression in spontaneous feline olfactory neuroblastomas. **Acta Neuropathologica**, v. 80, n. 5, p. 547–553, 1990.

SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. p. 136–149.

SILVA, R. G. Da; COSTA, M. J. R. P. Da; SOBRINHO, A. G. S. Influence of hot environments on some blood variables of sheep. **International Journal of Biometeorology**, v. 3, p. 223–225, 1992.

SONG, S. G.; LEE, J.; KOH, J.; KIM, S.; CHUNG, D. H.; JEON, Y. K. Utility of PD-L1 immunocytochemistry using body-fluid cell blocks in patients with non-small-cell lung cancer. **Diagnostic Cytopathology**, v. 48, n. 4, p. 291–299, 2020.

SPARKES, A. H.; HOPPER, C. D.; MILLARD, W. G.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline Immunodeficiency Virus Infection Clinicopathologic Findings in 90 Naturally Occurring Cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 85–90, 1993.

STACY, N. I.; HARVEY, J. W. Bone Marrow Aspirate Evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 47, n. 1, p. 31–52, 2017.

STAVISKY, J.; DEAN, R. S.; MOLLOY, M. H. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011-2012). **The Veterinary record**, v. 181, n. 17, p. 451, 2017.

STOKER, A. W.; BISSELL, M. J. Quantitative immunocytochemical assay for infectious avian retroviruses. **Journal of General Virology**, v. 68, n. 1987, p. 2481–2485, 1987.

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. 192–7, 2010.

SUNTZ, M.; FAILING, K.; HECHT, W.; SCHWARTZ, D.; REINACHER, M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 1–2, p. 71–80, 2010.

SYKES, J. E. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: J. E. Sykes (Ed.). **Canine and feline infectious diseases**. 1. Ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2014. p. 214–221.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: Jane E Sykes (Eds.). **Canine and feline infectious diseases**. 1. Ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences, 2014. p.222–235.

SZILASI, A.; DÉNES, L.; KRIKÓ, E.; HEENEMANN, K.; ERTL, R.; MÁNDOKI, M.; VAHLENKAMP, T. W.; BALKÁ, G. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 5, n. 2, p. 205511691989209, 2019.

TAVASSOLI, M. Modulation of megakaryocyte emperipolesis by phlebotomy: megakaryocytes as a component of marrow-blood barrier. **Blood cells**, v. 12 1, p. 205–216, 1986.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004.

TOMA, C.; BÂLTEANU, V. A.; TRIPON, S.; TRIFA, A.; REMA, A.; AMORIM, I.; POP, R. M.; POPA, R.; CATOI, C.; TAULESCU, M. Exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus type 2 (exJSRV2) related to ovine pulmonary adenocarcinoma (OPA) in Romania: prevalence, anatomical forms, pathological description, immunophenotyping and virus identification. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 296, 2020.

TOTH, S. R.; ONIONS, D. E.; JARRETT, O. Histopathological and Hematological Findings in Myeloid Leukemia Induced by a New Feline Leukemia Virus Isolate. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 4, p. 462–470, 1986.

TURINELLI, V.; GAVAZZA, A. Retrospective study of 152 feline cytological bone marrow examinations: preliminary classification and ranges. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 12, p. 1158–1168, 2018.

VALENCIANO, A. C.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L. Interpretation of Feline Leukocyte Responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 335–344.

VICENTE SOBRINHO, L. S.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; ROSSI, C. N.; MARCONDES, M. Serofrequency of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats of Araçatuba, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 378–383, 2011.

VOGT, A. H.; RODAN, I.; BROWN, M.; BROWN, S.; FORMAN, M. J. L.; NEILSON, J.; SPARKES, A. AAFP – AAHA Feline Life Stage Guidelines Background and Goals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, p. 70–85, 2010.

WEISS, A. FeLV-associated chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 12, p. 995–996, 2010.

WEISS, D. J. Differentiating benign and malignant causes of lymphocytosis in feline bone marrow. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 19, n. 6, p.855–59, 2005. a.

WEISS, D. J. A retrospective study of the incidence and classification of bone marrow disorder in cats (1996-2004). **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, n. 4, p. 179–185, 2006.

WEISS, D. J.; AIRD, B. Cytologic Evaluation of Primary and Secondary Myelodysplastic Syndromes in the Dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 2, p. 67–75, 2001.

WEISS, D.; WARDROP, K. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2010.

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

WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 16–23, 2013.

WITHOEFT, J. A.; CRISTO, T. G.; BIEZUS, G.; COSTA, L. S.; PONT, T. P. D.; FREITAS, A. C.; TRAVERSO, S. D.; CASAGRANDE, R. A. Causes of death and euthanasia in domestic cats in the Santa Catarina plateau (1995-2015). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 192–200, 2019.

WOOD, L. J.; SEHMI, R.; DORMAN, S.; HAMID, Q.; TULIC, M. K.; WATSON, R. M.; FOLEY, R.; WASI, P.; DENBURG, J. A.; GAUVREAU, G.; O'BYRNE, P. M. Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin-5 expression in subjects with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 6, p. 883–889, 2002.

WORKMAN, H. C.; VERNAU, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: The veterinary perspective. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1379–1399, 2003.

YAMADA, O.; TAMURA, K.; YAGIHARA, H.; ISOTANI, M.; AZAKAMI, M.; SAWADA, S.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Light-chain multiple myeloma in a cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 443–447, 2007.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of FIV and FELV Infections in Cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, n. 1, p. 69–70, 2000.

ZINKL, J. G.; LECOUEUR, R. A.; DAVIS, D. C.; SAUNDERS, G. K. "Flaming" Plasma Cells in a Dog with IgA Multiple Myeloma. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, n. 3, p. 15–19, 1983.

APÊNDICES

APÊNDICE A-1



LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

TERMO DE CONSENTIMENTO

ICQ _____

Nome do pesquisador principal: Renata Assis Casagrande

Título do projeto: Avaliação da eficiência do ELISA, PCR e imuno-citoquímica (ICQ) no diagnóstico do vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) em gatos

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UDESC
(CEUA/UDESC) nº: 2306130319

Objetivos do estudo: Determinar e padronizar um protocolo de imuno-citoquímica para a detecção dos vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) e verificar a sua eficiência comparando com os métodos de diagnóstico mais utilizados para este fim, nas suas diversas formas de infecção e manifestações clínicas.

Procedimentos a serem realizados com os animais: Os procedimentos serão realizados, em sua maioria, em duas (2) visitas:

1ª: Realização da avaliação clínica do paciente e aplicação de um questionário sobre o animal a ser respondido pelo tutor e pelo pesquisador, e colheita de amostra de sangue periférico para avaliação hematimétrica e realização de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação em cadeia de polimerase (PCR) para diagnóstico de FeLV e FIV.

1 ou 2ª: Realização de biópsia de medula óssea mediante anestesia para confecção de mielograma e avaliação imuno-citoquímica (ICQ) para diagnóstico de FeLV e FIV.

Em todos os felinos será realizado o exame clínico que consiste na inspeção externa do felino (escore corporal, condição da pelagem, presença de ectoparasitos, lesões de pele), inspeção das mucosas, avaliação do tamanho e consistência dos linfonodos, inspeção da cavidade oral (quanto a presença de tártaros, gengivite e estomatite), auscultação cardiopulmonar, temperatura corporal, exame ortopédico e neurológico completo. Dos animais participantes serão colhidos 5ml de sangue periférico por punção de veia jugular ou cefálica para realização de hemograma, ELISA e PCR.

A amostra de medula óssea será obtida mediante acesso do canal medular na região de tuberosidade deltoide de úmero. O procedimento tem duração mínima de 5 minutos e máxima de 15 minutos. Todo o procedimento será realizado com o animal anestesiado e, após a colheita, fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antibiótico serão fornecidos para o paciente.

Potenciais riscos para os animais: Apesar de seguro e rotineiro destaca-se o risco da ocorrência de reações fisiopatológicas cardiorrespiratórias, que incomumente ocorrem durante o procedimento anestésico, e podem culminar com o óbito do paciente. O procedimento de aspiração da medula óssea costuma ser seguro e de fácil realização, porém em casos raros o acesso ósseo pode promover inflamações periosteais e microfraturas.

Cronograma de execução do projeto:

Ano	Mês	Descrição das fases
2019-2021	04/2019 a 06/2021	Avaliação clínica dos animais e aplicação de questionários aos tutores
2019-2021	04/2019 a 06/2021	Colheita de amostras de sangue e medula óssea dos gatos
2019-2021	04/2019 a 07/2021	Realização dos testes de ELISA, PCR e ICQ para diagnóstico de FeLV/FIV dos gatos
2019-2021	10/2019 a 08/2021	Catologação dos dados obtidos nos exames de ELISA, PCR, ICQ e mielograma
2021	08, 09 e 10	Publicação dos resultados e conclusões da pesquisa desenvolvida

APÊNCIDE A-2



LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Benefícios:

Com o desenvolvimento deste projeto busca-se investigar a eficiência de métodos diferentes de diagnóstico para o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), assim como a padronização de um novo método para este fim. Os resultados desta pesquisa proverão aos clínicos de pequenos animais melhores informações sobre a eficácia destes testes, facilitando a escolha do método ideal para cada paciente de acordo com a apresentação clínica, tornando o diagnóstico desta enfermidade de forma mais eficiente nos gatos domésticos. Além disso, espera-se que os dados acerca da ocorrência de FeLV nos animais da região continue a induzir a implantação de medidas de controle e prevenção deste vírus.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto:

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste 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.

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (49) 99175-0779 (Thierry Grima de Cristo)

Equipe: Grupo de Patologia Veterinária - GPV

Nome do Pesquisador: Renata Assis Casagrande

Endereço: Avenida Luiz de Camões, no 2090, Conta Dinheiro, Lages, SC.


Telefone: (49) 3289-9160

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) / rebanho a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

Lages – SC, ____ / ____ / ____

Nome do Responsável / RG
Assinatura do Responsável



Renata Assis Casagrande / RG
Assinatura do Pesquisador

Identificação do animal (repetir tantas vezes quantos forem os animais):

Nome: _____ Número de identificação: _____

Espécie: _____ Raça: _____

APÊNCIDE B



LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO: _____

Avaliação da eficiência do ELISA, PCR e imuno-citoquímica (ICQ) no diagnóstico do vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) em gatos

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

1. Ficha do HCV: _____ 2. I.P.: _____

3. Nome: _____

IDENTIFICAÇÃO DO TUTOR:

4. Nome: _____

5. Endereço: _____

6. Tel.: () _____ () _____

7. @: _____

8. O Respondente é o Proprietário?

() 0- Não

() 1- Sim

9. Se não, qual sua relação com o proprietário?

() 1- Família

() 2- Funcionário

() 3- Outro: _____

INFORMAÇÕES A SEREM RESPONDIDAS PELO TUTOR

10. Idade do animal: _____ 11. Raça: _____

12. Sexo:

() 1- Macho

() 2- Fêmea

13. O gato é castrado?

() 0- Não

() 1- Sim

14. Se sim, com que idade foi castrado? _____

15. O gato é vacinado?

() 0- Não

() 1- Sim

Se sim, responda as questões abaixo:

16. Qual a frequência de vacinação:

() 1- Todo ano

() 2- A cada dois anos

() 3- Esporadicamente

17. Qual a data da última vacinação (M/A): _____

18. A vacina utilizada possuía proteção contra FeLV:

() 0- Não

() 1- Sim

() 2- Não sei

19. Com que frequência o animal vai ao veterinário?

() 1- É a primeira vez

() 2- Mensalmente

() 3- Trimestralmente

() 4- Anualmente

() 5- Só quando está doente

20. Qual a procedência do seu animal?

() 1- Nasceu em criadouro, C.V. ou agropecuária

() 2- Nasceu em domicílio

() 3- Nasceu na casa onde vive

() 4- Foi resgatado da rua

() 5- Ganhou e não sabe a procedência

21. Domiciliado em:

() 1- Apartamento

() 2- Casa

() 3- Pátio

() 4- Sítio

22. O gato possui acesso à rua?

() 0- Não

() 1- Sim

23. Outros gatos têm acesso ao local onde ele vive?

() 0- Não

() 1- Sim

() 2- Não sei

24. Coabita com outros gatos?

() 0- Não

() 1- Sim

Se sim, responda as questões abaixo:

25. Com quantos gatos coabita? _____

26. Compartilha caixa sanitária, pote de água/comida?

() 0- Não

() 1- Sim

27. Se não tem contato através de visitas a domicílios que tenham outros gatos, ou ficam hospedados em estabelecimentos veterinários?

() 0- Não

() 1- Sim

28. Tem comportamento agressivo com outros gatos?

() 0- Não

() 1- Sim

() 2- Só antes da castração

29. Já fez algum teste para diagnóstico de FeLV/FIV?

() 0- Não

() 1- Sim

() 2- Não sei

30. Se sim, lembra qual o resultado? _____

31. Teve alguma doença prévia? _____

INFORMAÇÕES PREENCHIDAS PELO AVALIADOR

32. Responsável pelo preenchimento: _____

33. Qual o estado de saúde do paciente:

() 1- Saudável (check-up) () 2- Saudável (castração)

() 3- Doente

34. Se doente, qual diagnóstico presuntivo? _____

35. Se doente, quais os sinais clínicos encontrados? _____

36. Qual o escore corporal do animal:

() 1- Caquético () 2- Magro () 3- Regular

() 4- Sobrepeso () 5- Obeso

37. Observações: _____

38. DATA DO PREENCHIMENTO: ____/____/____

APÊNDICE C



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficiência do ELISA, PCR e imuno-citoquímica (ICQ) no diagnóstico do vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) em gatos", protocolada sob o CEUA nº 2306130319 (ID 000831), sob a responsabilidade de **Renata Assis Casagrande e equipe; Paulo Eduardo Ferian; Fabiano Zanini Salbego; Thierry Grima de Cristo; Giovana Biezu; Willian Kaida de Almeida; Luara da Rosa; Taís Gaspar** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 15/03/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the efficiency of ELISA, PCR and immuno-cytochemistry (ICQ) in the diagnosis of leukemia virus (FeLV) and immunodeficiency (IVF) in cats", utilizing 188 Cats (males and females), protocol number CEUA 2306130319 (ID 000831), under the responsibility of **Renata Assis Casagrande and team; Paulo Eduardo Ferian; Fabiano Zanini Salbego; Thierry Grima de Cristo; Giovana Biezu; Willian Kaida de Almeida; Luara da Rosa; Taís Gaspar** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 03/15/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **06/2021**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Hospital Veterinário do CAV/UDESC**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **003 a 300 meses**

N: **188**

Linhagem: **Dependente da disponibilidade**

Peso: **500 a 10000 g**

Local do experimento: Hospital de Clínica Veterinária e Laboratório de Patologia Animal, Av. Luiz de Camões, 2090 - Conta Dinheiro, Lages - SC. tel. (49) 3289-9100

Lages, 18 de março de 2019

Marcia Regina Pfuetsenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

APÊNDICE D



LABORATÓRIO DE PATOLOGIA ANIMAL

Centro de Ciências Agroveterinárias

Universidade do Estado de Santa Catarina



Resultado do Mielograma – ICQ.XXX

Nome do Animal: Preta Tutor: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 Espécie: *Felis catus* (Felina) Raça: SRD Sexo: Fêmea Idade: 36 meses

Histórico: Animal do projeto ICQ - FeLV/FIV; Vive em um sítio, uma contactante FIV+.

Técnica para colheita de amostra: Punção de medula óssea do processo deltoide do úmero.

Técnica de coloração: May Grunwald-GIEMSA (3'-15')

Diferenciação celular (500 células em aumento de 1000x em imersão por microscopia de luz):

Série Hematopoética	Absoluto	%	Referência %
Mieloide			
Mieloblasto	5	1,0	0 – 0,4
Promielócito	10	2,0	0 – 3,0
Mielócito neutrofílico	10	2,0	4,4 – 13,2
Metamielócito neutrofílico	21	4,2	0,6 – 8,0
Neutrófilo bastonete	91	18,2	12,8 – 16,6
Neutrófilo segmentado	112	22,4	6,8 – 22,0
Mielócito eosinofílico	1	0,2	0,8 – 3,2 (Soma da série eosinofílica)
Metamielócito eosinofílico	2	0,4	
Eosinófilo bastonete	14	2,8	
Eosinófilo segmentado	20	4,0	
Série basofílica	3	0,6	0 – 0,4
Eritroide			
Rubriblasto	4	0,8	0 – 0,8
Prorubricito	11	2,2	0 – 1,6
Rubricito	106	21,2	10,2 – 29,4
Metarubricito	29	5,8	1,0 – 10,4
Outros			
Linfócitos	46	9,2	11,6 – 21,6
Plasmócitos	10	2,0	0,2 – 1,6
Monócitos	4	0,4	0 – 0,2
Macrófagos	0	0	0 – 0,2
Serie megacariocítica	3	0,6	Raros
Mastócitos	0	0	
Osteoclastos	0	0	
Adipócitos	0	0	
Células do estroma	0	0	
Observações			
Proporção Mieloide : Eritroide	1,93 (Ref: 1,21 – 2,16)		
Mitoses	2		

Valores de referência de acordo com JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993.

Comentários: Cerca de 8 megacariócitos por campo de menor aumento (100x). Ressalta-se que a resposta medular moderadamente aumentada para produção de eosinófilos é compatível com o número de eosinófilos observado no sangue periférico submetido ao hemograma. Essa alteração pode ser consequência de um quadro de parasitose ou processos alérgicos.