

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA -UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GIOVANA BIEZUS

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV): ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DOS DESFECHOS PROGRESSIVOS E
REGRESSIVOS E IDENTIFICAÇÃO DOS SUBGRUPOS ASSOCIADOS AO LINFOMA
E A LEUCEMIA**

**LAGES
2021**

GIOVANA BIEZUS

**INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV): ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DOS DESFECHOS PROGRESSIVOS E
REGRESSIVOS E IDENTIFICAÇÃO DOS SUBGRUPOS ASSOCIADOS AO LINFOMA
E A LEUCEMIA**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de doutorado em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande
Co-orientador: Dr. Paulo Eduardo Ferian

LAGES, SC

2021

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

Biezus, Giovana
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) :
ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E
HEMATOLÓGICOS DOS DESFECHOS PROGRESSIVOS E
REGRESSIVOS E IDENTIFICAÇÃO DOS SUBGRUPOS
ASSOCIADOS AO LINFOMA E A LEUCEMIA / Giovana Biezus.
-- 2021.
131 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, 2021.

1. Medicina felina. 2. Doença viral. 3. Fatores associados. 4.
Anemia. 5. Subgrupos de FeLV. 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. Titulo.

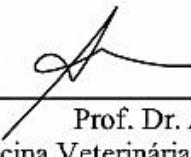
GIOVANA BIEZUS

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV): ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DOS DESFECHOS PROGRESSIVOS E REGRESSIVOS E IDENTIFICAÇÃO DOS SUBGRUPOS ASSOCIADOS AO LINFOMA E A LEUCEMIA

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito a obtenção do título de doutorado em Ciência Animal.

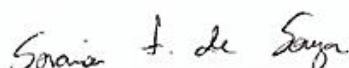
BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Prof.^a Dra. Renata Assis Casagrande
Departamento de Medicina Veterinária, UDESC/ Lages, SC

Membro: 
Prof. Dr. Álvaro Menin
Medicina Veterinária, UFSC/ Curitibanos, SC

Membro: 
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
UFMG/ Belo Horizonte, MG

Membro: 
Prof.^a Dra. Marcia Moleta Colodel
Departamento de Medicina Veterinária, UDESC/ Lages, SC

Membro: 
Prof.^a Dra. Soraia Figueiredo de Souza
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, UFAC/ Rio Branco, AC

LAGES, dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o andamento deste trabalho. De maneira especial, à minha orientadora Profa. Dra. Renata Assis Casagrande, obrigada pela confiança e por fornecer as condições para o desenvolvimento desta tese. Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Ferian, meu co-orientador, que mesmo distante se dispôs a continuar nesta caminhada conosco. Às colegas de pós-graduação, Me. Mariana Casa e Me. Gabriella Bassi das Neves por todo o auxílio na área de biologia molecular, os louros desse trabalho serão seus também. Aos professores, Dr. Luiz Claudio Milette e Dr. Ubirajara Maciel da Costa e toda a equipe dos seus respectivos laboratórios que ofereceram o subsídio técnico e pela paciência em sanar minhas dúvidas.

Sou grata a toda equipe do Laboratório de Patologia Veterinária. Em especial, gostaria de agradecer aos colegas Me. Thierry Grima de Cristo, Ma. Aline da Rosa Maciel, Ma. Jéssica Aline Withoeft, Me. Leonardo Costa e Me. Fábio Santiani pela amizade e auxílio em diversas situações. Toda a equipe de acadêmicos da graduação, hoje já formados, que fizeram parte dos projetos de pesquisa relacionados ao meu doutorado MV. Claudia Maria Flores Koehler, MV. Leticia Vitoria Furlan, MV. Gustavo Ribeiro Bonatto, MV. Taís Gaspar e MV. Marcela Brüggemann de Souza Teixeira, vocês foram imprescindíveis, obrigada. Também a graduanda Amanda Larissa Vicente Medeiros, que apesar de não estar envolvida diretamente ao projeto, foi de vital importância para a conclusão deste trabalho.

Sou muito grata a todos os residentes e pós-graduandos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) que fizeram parte desta tese, também aos professores Dr. Fabiano Zanini Salbego e Dra. Márcia Moleta Colodel. Obrigada por cederem tão gentilmente os seus pacientes e nos auxiliarem em diversas situações, desde a coleta de amostras até a realização de exames laboratoriais e de imagem. Também agradeço a toda a equipe de funcionários da administração do HCV, pelo auxílio em todos os momentos requisitados.

Agradeço 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, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de doutorado.

Termina aqui um longo capítulo da minha vida acadêmica. Foram 14 anos residindo em Lages, SC e fazendo da UDESC o meu lar, como graduanda em Medicina Veterinária, residente de clínica médica de cães e gatos, mestrandona em ciência animal, professora de clínica médica

de cães e gatos e por fim, doutoranda em ciência animal. Nem tudo se resume aos títulos obtidos com muito sacrifício, muitos foram os amigos que ficaram pelo caminho e aqueles que carrego para a vida inteira.

Aos amigos (as) Marília G. Luciani, Kelly M. Fernandes, Luara da Rosa, Ana C. Moraes, Luana Barthel, Camila S. Hinckel, Cristiane B. Vargas, Cleiton Dal Prá, Michele F. S. Schade, Ysmaian Fischer, Felipe Carniel, Alessandra Berri, Jean C. Boesing, Karen S. Fuchs, Daiane Stürmer, Eloisa Zoboli, Maysa G. Xavier, Flavia Kaveski, Paula B Brizola, Juliana R. de Souza, Suelen Dal Pozzo, Leandro Mattei, Felipe A. Batistella, Marina M. Antunes, Leonardo Haskel, aos citados anteriormente e aos que posso ter esquecido, obrigada por terem feito desta jornada inesquecível.

Aos meus pais João Carlos Biezus, Regina Silveira de Souza e meu irmão, Guilherme Biezus obrigada pelo apoio. Ao meu marido e amigo, Émerson Couto da Rocha, só tenho a agradecer, finalmente terminou, mais uma fase que fica na nossa história. Aos meus amados pets, que foram minha companhia, é tanto amor contido em quatro patas que não é possível descrever.

Por fim, quero agradecer aos meus pacientes e seus tutores, que lutaram bravamente contra este vírus devastador. Aos que se foram, minha eterna gratidão por terem me permitido acompanhar a sua jornada.

RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um importante agente infeccioso em gatos, possui elevada prevalência no Brasil e é diagnosticado comumente pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), limitado a detectar animais em viremia enquanto, a reação em cadeia de polimerase (PCR) detecta DNA proviral em diferentes desfechos da infecção. Este estudo, dividido em três artigos, caracterizou: os achados epidemiológicos, alterações clínicas e hematológicas, a evolução do quadro infeccioso e o tempo de sobrevida para os desfechos progressivo (FeLV⁺P) e regressivo (FeLV⁺R) da infecção por FeLV; e determinou os subgrupos em gatos com linfoma e leucemia. Foram selecionados 385 gatos, provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do CAV-UDESC, no período de novembro de 2015 a dezembro de 2019. Os gatos foram testados pelo método de ELISA, para antígeno p27 do FeLV e anticorpo contra p24 do FIV, e por nested-PCR para DNA proviral da região U3-LTR e gene *gag* do FeLV. O primeiro artigo determinou que a prevalência para FeLV⁺P foi de 34,4% (95% IC: 29,6-39,1%) e FeLV⁺R é 10,4% (95% IC: 7,4-13,4%); gatos sem raça definida (SRD) e machos são 2,8 e 3 vezes mais propensos a infecção progressiva e gatos FIV positivos tiveram 4,8 vezes mais chance de serem regressivos; animais FeLV⁺P apresentaram alterações hematológicas mais pronunciadas que FeLV⁺R, principalmente a trombocitopenia e a anemia. O segundo artigo obteve que o tempo mediano de sobrevivência foi 30 dias para o grupo FeLV⁺P e não foi alcançado nos demais grupos; o estado de saúde e a infecção progressiva por FeLV aumentaram em 4 e 5 vezes o *hazard ratio* (HR) para o desfecho óbito na população; as principais causas de óbito no grupo FeLV⁺P foram linfoma (28), leucemia (18) e alterações hematológicas de causa indeterminada – AHCI (12). As causas de óbito em FeLV⁺R foram leucemia (2), AHCI (1), peritonite infecciosa felina (PIF) (1) e carcinoma de células escamosas (1). O terceiro artigo identificou que 68,7% dos gatos com linfoma (16) eram FeLV-A e FeLV-B positivos (FeLV-AB) e 31,3% eram FeLV-A; 70% dos gatos leucemia (10) eram FeLV-AB e 30% FeLV-A; as sequências FeLV-A obtidas possuem relação próxima com as variantes Arena, 36TTenv-16, Glasgow-1 e FeLV-81TTenv-1; as sequências FeLV-B são divergentes entre si e similares ao FELV endógeno. Os resultados obtidos nos estudos refletem alta prevalência de FeLV no país, demonstram o impacto devastador da infecção progressiva e a diversidade genética envolvida na patogênese das neoplasias associadas ao FeLV.

Palavras-chave: medicina felina, doença viral, fatores associados, anemia, subgrupos de FeLV.

ABSTRACT

Feline leukemia virus (FeLV) is an important infectious agent in cats with high prevalence in Brazil. Commonly, FeLV is diagnosed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which identifies viremic cats. The polymerase chain reaction (PCR) assay amplifies FeLV proviral DNA and detects different infections outcomes. This research was written in three papers that characterized: epidemiologic outcomes; clinical and hematological findings; the evolution of FeLV infection outcomes; survival times for progressive (FeLV^{+P}) and regressive (FeLV^{+R}) FeLV infection outcomes; and determined FeLV subgroups in feline lymphoma and leukemia. Therefore, 385 cats were selected from the Hospital of Veterinary Clinical between November 2015 and December 2019. The cats were tested by ELISA for FeLV p27 antigen and FIV p24 antibodies. The animals were also tested by nested-PCR for FeLV proviral DNA from U3-LTR region and *gag* gene. In the first paper, the prevalence for FeLV^{+P} was 34,4% (95% IC: 29,6-39,1%) and 10,4% (95% IC: 7,4-13,4%) for FeLV^{+R}; cross-breeds cats and male was 2,8 and 3 times more likely to be progressively infected, while FIV-positive cats were 4,8 time more likely to be regressively infected; FeLV^{+P} cats showed more pronounced hematological manifestations than did FeLV^{+R} cats, especially anemia and thrombocytopenia. In the second paper, the median survival times for FeLV^{+P} was 30 days and was not reached for the other groups; health conditions and progressive infection increased 4 and 5 times the death hazard ratio (HR) in the population; the main death causes in FeLV^{+P} group were lymphoma (28), leukemia (18), hematologic abnormality of unidentified causes – HAUC (12). The death causes in the FeLV^{+R} group were leukemia (2), HAUC (1), feline infectious peritonitis (FIP) (1), and squamous cell carcinoma (1). In the third paper, 68,7% of the cats that had lymphoma (16) were FeLV-A and FeLV-B positive (FeLV-AB), while 31,3% were only FeLV-A positive; in cats with leukemia (10), 70% were FeLV-AB, and 30% were FeLV-A positive; FeLV-A sequences was related with Arena, 36TTenv-16, Glasgow-1 and FeLV-81TTenv-1 variants, while FeLV-B sequences was divergent from each other's and similar to *env*FeLV. The research highlights the high FeLV prevalence in Brazil, the devastating impact of the FeLV progressive infection, and the genetic diversity in the FeLV-associated neoplasms pathogenesis.

Keywords: feline medicine, viral disease, associated factors, anemia, FeLV subgroups.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Três felinos com infecção progressiva por FeLV, apresentando complexo gengivite estomatite felino (CGEF) com graus de lesão: (A) leve, onde observa-se (nas setas) gengiva eritematosa ao redor dos incisivos, erosão com superfície avermelhada focal e unilateral na gengiva e palato mole; (B) moderado, no qual as erosões tendem a ser focalmente extensas e bilaterais na gengiva, partindo dos molares até o palato mole (setas); e (C) acentuada, onde nota-se (nas setas) gengiva eritematosa ao redor dos incisivos e aprofundamento das erosões gengivais, destruição da mucosa e hemorragia leve a moderada, inclusive margeando molares e pré-molares..... 69

Figura 2 — Cavidade torácica de dois gatos com infecção progressiva por FeLV, apresentando: (A) necrose difusa de lobos pulmonares, com presença de deposição de fibrina na superfície pleural e secreção purulenta devido a broncopneumonia e pleuropneumonia necrosupurativa difusa por *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella ozaenae*; (B) Massa extensa em região de mediastino, recobrindo dois terços da cavidade torácica e presença de líquido serosanguinolento devido a linfoma de mediastino..... 9671

Figura 3 — A: gato, SRD, macho, com infecção progressiva por FeLV, apresentando palidez em plano nasal devido a anemia arregenerativa e petéquias em região ventral de pescoço (B) devido a trombocitopenia; C: Efusão abdominal coletada de uma gata, SRD, com infecção progressiva por FeLV, apresentando aumento de volume abdominal (D) em decorrência de Peritonite Infecciosa Felina (PIF)..... 77

Figura 4 — Árvore filogenética obtida a partir de sequências parciais do gene *env* do FeLV de gatos diagnosticados com linfoma e leucemia. Somente valores de *bootstrap* ≥ 70 são visualizados..... 100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Prevalência da infecção por FeLV e FIV em gatos de diferentes países de acordo com o método diagnóstico e origem.....	36
Quadro 2 — Descrição dos primers utilizados e tamanho dos amplicons gerados para identificação dos subtipos FeLV-A e FeLV-B.....	966

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Análise de concordância entre os métodos de diagnóstico nested-PCR e ELISA para a infecção pelo FeLV em gatos.....	45
Tabela 2 — Análise estatística descritiva de uma população hospitalar de gatos (n=381) do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando os desfechos progressivo (FeLV+P) e regressivo (FeLV+R) da infecção por FeLV.....	46
Tabela 3 — Distribuição da idade dos gatos (n=381) de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando os desfechos da infecção para FeLV.....	46
Tabela 4 — Razão de chance e valores de p estimados pela análise univariada dos fatores associados ao desfecho progressivo (FeLV+P) e regressivo (FeLV+R) para a infecção por FeLV em gatos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil.....	47
Tabela 5 — Razão de chance e valores de p estimados pela análise de regressão logística multinomial para fatores associados ao desfecho progressivo (FeLV+P) e regressivo (FeLV+R) para a infecção por FeLV em gatos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil.....	48
Tabela 6 — Frequência das alterações hematológicas dos gatos com infecção progressiva por FeLV (FeLV+P), regressiva (FeLV+R), FeLV+P coinfetados com FIV (FeLV+P e FIV+) e FeLV+R coinfetados com FIV (FeLV+R e FIV+) oriundos de uma população hospitalar.....	49
Tabela 7 — Análise estatística das variáveis hematológicas dos gatos com infecção progressiva por FeLV (FeLV+P), regressiva (FeLV+R) e FeLV e FIV negativos e saudáveis (Controle) oriundos de uma população hospitalar.....	51
Tabela 8 — Distribuição dos gatos de cada grupo (FeLV+P, FeLV+R e controle) de acordo com as variáveis estudadas na análise de sobrevivência	64
Tabela 9 — Razão de risco e valores de p estimados, pela análise de regressão de Cox, para as variáveis associadas as curvas de sobrevivência dos gatos.....	66
Tabela 10 — Razão de risco e valores de p estimados, pela análise de regressão de Cox, para as covariáveis associadas as curvas de sobrevivência dos gatos de acordo com os grupos FeLV+P (n=110), FeLV+R (n=23) e grupo controle (n=21).....	66
Tabela 11 — Frequência das manifestações clínicas e óbitos, em gatos com infecção progressiva (FeLV+P), regressiva (FeLV+R) e negativos para FeLV (Controle), observadas no período de novembro de 2015 a agosto de 2019.....	67

Tabela 12 — Índice de condição corporal e sinais clínicos observadas no exame físico dos gatos com infecção progressiva e regressiva por FeLV que desenvolveram alteração hematológica de causa indeterminada (AHC), linfoma ou leucemia.....	74
Tabela 13 — Hemograma dos gatos com infecção progressiva e regressiva por FeLV diagnosticados com leucemia e alteração hematológica de causa indeterminada (AHC).....	76
Tabela 14 — Gatos com infecção progressiva pelo FeLV (FeLV+P) e regressiva (FeLV+R) submetidos ao ELISA e nested-PCR para controle de positividade: resultados obtidos, de acordo com o método diagnóstico, no momento da inclusão do felino no estudo versus final do acompanhamento clínico.....	79
Tabela 15 — Análise descritiva da amostra (n=26) de gatos com linfoma ou leucemia, de acordo com os subgrupos A e B de FeLV.....	98
Tabela 16 — Distribuição dos linfomas em gatos de acordo com a forma anatômica, grau de malignidade, classificação histológica e os subgrupos A e B de FeLV.....	98
Tabela 17 — Distribuição das leucemias em gatos com infecção progressiva por FeLV de acordo com a classificação histológica e os subgrupos A e B de FeLV.....	99
Tabela 18 — Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de aminoácidos do gene env de FeLV-A e FeLV-B obtidos no estado de Santa Catarina, Brasil e sequências de env FeLV-A, FeLV-B e enFeLV obtidas no <i>Genbank</i>	130

LISTA DE ABREVIATURAS

AAFP	<i>American Association of Feline Practitioners</i>
AHCI	Alteração hematológica de causa indeterminada
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CCE	Carcinoma de células escamosas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGEF	Complexo gengivite estomatite felina
CHCM	Concentração de hemoglobina corporcular média
DTUIF	Doença do trato urinário inferior dos felinos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DU	Pirofosfatase desoxiuridina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
enFeLV	Vírus da leucemia felina endógeno
FeLV	<i>Feline leukemia virus</i>
FeSV	<i>Gardner-Arnstein feline sarcoma virus</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
IF	Imunofluorescência
Kb	Kilobase
LAPA	Laboratório de Patologia Animal
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
MDS	Síndrome mielodisplásica
NCIWF	<i>National Cancer Institute Working Formulation</i>
NI	Não informado
pb	Pares de base
PIF	Peritonite infecciosa felina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase
SIC	Sítio de Integração Comuns
SRD	Sem raça definida

SU	Glicoproteína de superfície
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VG	Volume globular
VGM	Volume globular médio
WSAVA	<i>World Small Animal Veterinary Association</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 <i>Feline leukemia virus</i> (FeLV)	20
3.1.1 Estrutura e genoma do vírus	20
3.1.2 Transmissão e infecção.....	22
3.1.2.1 <i>Infecção progressiva.....</i>	23
3.1.2.2 <i>Infecção regressiva.....</i>	23
3.1.2.3 <i>Infecção abortiva.....</i>	24
3.1.3 Aspectos clínicos da infecção por FeLV	24
3.1.4 Prevenção da infecção por FeLV	28
3.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)	29
3.2.1 Estrutura e genoma do vírus	29
3.2.2 Transmissão e infecção.....	30
3.2.3 Aspectos clínicos da infecção por FIV	31
3.2.4 Prevenção da infecção por FIV	32
3.3 DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DE FeLV E FIV	33
3.3.1 Diagnóstico de FeLV e FIV	33
3.3.2 Prevalência de FeLV e FIV	35
4 ARTIGO 1	38
4.1 PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E PERFIL HEMATOLÓGICO DOS GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA E REGRESSIVA PELO <i>Feline leukemia virus</i> (FeLV) NO PLANALTO DE SANTA CATARINA, BRASIL.....	38
4.2 RESUMO	38
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.4.1 Amostragem	40

4.4.2 Obtenção e processamento das amostras de sangue	41
4.4.3 Diagnóstico da infecção por FeLV e diferencial para FIV	41
4.4.4 Determinação dos desfechos da infecção por FeLV e a coinfecção por FIV....	43
4.4.5 Colheita dos dados epidemiológicos	43
4.4.6 Análise estatística.....	43
4.4.7 Comissão de Ética no Uso de Animais	44
4.5 RESULTADOS	44
4.6 DISCUSSÃO	51
4.7 CONCLUSÃO.....	58
5 ARTIGO 2	59
5.1 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA OU REGRESSIVA PELO <i>Feline leukemia virus</i> (FeLV).	59
5.2 RESUMO	59
5.3 INTRODUÇÃO.....	60
5.4.1 Seleção da amostra	61
5.4.2 Determinação do desfecho da infecção para FeLV	62
5.4.3 Acompanhamento clínico.....	62
5.4.4 Análise de sobrevivência	63
5.4.5 Análise dos dados clínicos	63
5.5 RESULTADOS	64
5.5.1 A amostra	64
5.5.2 Análise de sobrevivência	64
5.5.3 Acompanhamento clínico.....	67
5.5.4 Controle do desfecho da infecção	78
5.6 DISCUSSÃO	79
5.7 CONCLUSÃO.....	89
6 ARTIGO 3	90
6.1 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS SUBGRUPOS A E B DO <i>Feline leukemia virus</i> (FeLV) EM GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA E DIFERENTES TIPOS DE LINFOMA OU LEUCEMIA	90

6.2 RESUMO	90
6.3 INTRODUÇÃO.....	91
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
6.4.1 Seleção da amostra	92
6.4.2 Classificação dos linfomas e leucemias	92
6.4.3 Colheita dos dados epidemiológicos	93
6.4.4 Obtenção e processamento das amostras	93
6.4.5 Determinação dos subgrupos de FeLV	93
6.4.6 Obtenção dos controles positivos e dos oligonucleotídeos para sequenciamento do FeLV-A.....	94
6.4.7 Análise filogenética	96
6.4.8 Comissão de Ética no Uso de Animais	97
6.5 RESULTADOS	97
6.6 DISCUSSÃO.....	101
6.7 CONCLUSÃO.....	106
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	107
8 REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Os vírus que pertencem à família *Retroviridae* possuem grande importância na Medicina Veterinária e apresentam significado clínico e sanitário variável, podendo ser encontrados nas principais espécies de animais domésticos (RAVAZZOLO; COSTA, 2007). Na medicina felina, *Feline leukemia virus* (FeLV) e *Feline immunodeficiency virus* (FIV) são os representantes desta família e são considerados os agentes infecciosos mais comuns nos gatos (LEVY, 2008).

Estes vírus apresentam ocorrência mundial e as prevalências da infecção por FeLV em gatos obtidas nos mais recentes estudos na região sul do Brasil variam, de 22,3% em Santa Catarina e 31% no Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Esses valores são significativamente maiores que as prevalências obtidas em outros países. No continente europeu a prevalência foi de 3,6%, enquanto na América do Norte variou de 3,3% nos Estados Unidos da América a 3,4% no Canadá e 7,5% no México (LURIA et al., 2004; GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; ORTEGA-PACHECO et al., 2014).

Por ser prático, rápido e fornecer resultados confiáveis, o teste de eleição para o diagnóstico de FeLV é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a maioria dos estudos epidemiológicos utilizam esse como método de diagnóstico (LURIA et al., 2004; GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; RAVI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012; ORTEGA-PACHECO et al., 2014; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). No entanto, métodos de diagnósticos voltados para a detecção de DNA proviral demonstram valores consideravelmente maiores de prevalência para o FeLV, como pode ser observado no estudo realizado, em uma população hospitalar composta os gatos sadios e doentes, no estado de Minas Gerais por Coelho e colaboradores (2008), onde a prevalência encontrada para FeLV foi de 47,5%. Prevalência esta, que é superior às obtidas em outros estados em que a população analisada possuía características similares (COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a).

Existem quatro possíveis desfechos para a infecção por FeLV, sendo que três deles apresentam importância clínica, são as infecções do tipo progressiva, regressiva e abortiva (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Do ponto de vista clínico, a doença progressiva é responsável por causar maior prejuízo à saúde do felino. No Brasil, a ocorrência de gatos com doenças causadas pelo FeLV, como consequência da infecção progressiva, é frequente na rotina da medicina felina, sendo reflexo da alta prevalência encontrada nos estudos realizados (COELHO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2012, 2016; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Por sua vez, a infecção regressiva é menos estudada, pois resulta em menor impacto na

saúde dos felinos apresentando resultados controversos entre os estudos (ROJKO et al., 1982; PACITTI et al., 1986; STÜTZER et al., 2011; NESINA et al., 2015). A investigação deste desfecho torna-se importante mediante o potencial de reativação do vírus, oncogênico e de transmissão em transfusões de sangue (ROJKO et al., 1982; PACITTI et al., 1986; SYKES; HARTMANN, 2014; NESINA et al., 2015).

Por sua vez, os gatos com FIV desenvolvem um estado de infecção persistente que pode ou não evoluir para a fase terminal da doença (YAMAMOTO et al., 1988). Enfermidades causadas pelo FIV são menos comuns na medicina felina e muitas vezes o *status* de positividade é um achado durante a triagem para a detecção desses retrovírus. Fato refletido pelas menores prevalências obtidas para a infecção e a sua similaridade nos diferentes países (LURIA et al., 2004; LITTLE et al., 2009; RAVI et al., 2010; COSTA et al., 2017 e BIEZUS et al., 2019a). Com relação a infecção por FIV, é provável que os menores valores obtidos para a prevalência ocorrem devido à baixa taxa de transmissão e ao longo período de duração da infecção, o que resulta em baixo impacto do vírus sobre a população (COURCHAMP et al., 1995).

A variação do resultado da infecção por FIV e FeLV, até o desenvolvimento da doença, envolve diversos fatores e diferentes apresentações clínicas são associadas a essas infecções virais. Gatos positivos para FeLV comumente desenvolvem anemia, leucemia, linfoma e coinfeções (BIEZUS et al., 2019 a, b; CRISTO et al., 2019 a, b). Doenças neoplásicas também podem ocorrer em gatos positivos para FIV, mas as infecções oportunistas, mielossupressão e doença neurológica são mais comuns (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; SYKES, 2014).

A literatura é rica sobre estes retrovírus e os estudos voltados à virologia, imunologia e biologia molecular são vários, porém não existem estudos nacionais que levem em consideração os fatores epidemiológicos e o acompanhamento clínico prolongado de gatos com os diferentes desfechos da infecção por FeLV e que avalie os subgrupos virais como fatores associados ao desenvolvimento da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os achados epidemiológicos, as alterações clínicas e hematológicas, a evolução do quadro infeccioso e o tempo de sobrevida após o diagnóstico de infecção por FeLV, e determinar os subgrupos de FeLV em gatos do Planalto Catarinense com linfoma e leucemia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência das infecções progressivas e regressivas por FeLV, na população de gatos do Planalto Catarinense.
- Determinar quais as variáveis epidemiológicas estão associadas a infecção progressiva e regressiva por FeLV.
- Comparar as variáveis hematológicas entre os gatos com infecção progressiva por FeLV, regressiva por FeLV e infectados pelo FIV.
- Determinar o tempo de sobrevida após o diagnóstico de FeLV na população de gatos do Planalto Catarinense.
- Determinar as alterações clínicas apresentadas pelos felinos com infecção progressiva e comparar com as apresentadas pelos felinos com infecção regressiva por FeLV.
- Determinar se existe diferença na sobrevida de gatos com infecção progressiva e regressiva por FeLV.
- Determinar os subgrupos e realizar a análise filogenética de FeLV envolvidos no desenvolvimento de linfoma e leucemia em gatos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Feline leukemia virus* (FeLV)

3.1.1 Estrutura e genoma do vírus

O FeLV pertence ao gênero *Gammaretrovirus* da família *Retroviridae* e foi descrito pela primeira vez em 1964 por Jarrett e colaboradores ao descobrirem partículas virais na membrana de células neoplásicas em um gato diagnosticado com linfoma na Universidade de Glasgow, Escócia. Este vírus é composto por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples associadas a proteínas. O vírus também possui na sua composição proteína de ação catalítica, são elas a protease, transcriptase reversa e a integrase, contidas juntamente com o RNA no nucleocapsídeo. Externamente ao nucleocapsídeo existe uma matriz proteica e por último o envelope lipoproteíco, onde se encontram as proteínas transmembrana e de superfície (SU) (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

Assim que o FeLV infecta uma célula seu material genético é transcrito pela enzima transcriptase reversa em DNA proviral que é incorporado ao material genético da célula hospedeira por meio da enzima viral integrase. Durante o processo natural de replicação celular a mesma passará a replicar também o material genético do vírus, como as regiões de repetição terminal longas (LTR – *long terminal repeats*) e os genes virais (*env*, *gag* e *pol*), que codificam proteínas estruturais e enzimas envolvidas na replicação viral (HOOVER; MULLINS, 1991).

O gene *env* é responsável por codificar a glicoproteína de superfície (SU) gp70 e a proteína transmembrana p15E. A proteína gp70 é responsável por definir o subgrupo viral e tem papel na indução da imunidade, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes. Essa é responsável por determinar o tropismo do vírus por determinadas células, pois interage diretamente com o receptor da célula hospedeira, causando alterações conformacionais que conduz a fusão do envelope viral e celular (LUTZ et al., 2009; BOLIN; LEVY, 2011). Todas essas características, fazem da proteína gp70 o principal componente das vacinas contra FeLV (WILLETT; HOSIE, 2013). Em termos de patogenia esta proteína também é responsável por levar ao desenvolvimento de doenças imunomediadas, devido a formação de complexos antígenos-anticorpos em animais com viremia progressiva (HARTMANN, 2012).

O gene *pol* codifica proteínas como a transcriptase reversa e a integrase, que vão fazer a transformação do RNA viral em DNA proviral e a sua integração no genoma hospedeiro. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais internas do vírus como p15 (matriz), p12, p27

(capsídeo) e p10 (nucleocapsídeo) (LUTZ et al., 2009). A p27 é produzida em grande quantidade pelas células infectadas, circula livremente no sangue e pode ser eliminada pela saliva (LEWIS et al., 1987; WESTMAN et al., 2017).

Na literatura são descritos vários subgrupos para o FeLV, sendo os três principais A, B e C (WILLETT; HOSIE, 2013). Todos estes subgrupos surgem porque o felino foi infectado previamente pelo FeLV tipo A que sofre mutação e recombinação com sequências retrovirais celulares ou sequência endógenas e que foram perpetuadas na sua linhagem (BENVENISTE et al., 1975; STEWART, 1986). O FeLV-A possui a capacidade de interagir com as células por meio do transportador de tiamina THTR1, presente em praticamente todos os tecidos felinos (MENDONZA et al., 2006). É importante ressaltar que essas sequências endógenas são produto de infecção por um FeLV ancestral que foi perpetuado por diversas gerações no genoma dos gatos (WILLETT; HOSIE, 2013).

O FeLV-B é produto da recombinação entre FeLV-A e sequências do gene *env* do FeLV endógeno (enFeLV) e utiliza o transportador de fosfato 1 (Pit-1) e 2 (Pit-2) para entrar nas células (JARRET; RUSSELL, 1978a; WILLETT; HOSIE, 2013). Esses receptores são expressos na maioria dos tecidos o que permite ao FeLV-B um amplo potencial de infecção (SUGAI et al., 2001). Tanto o FeLV tipo A quanto o tipo B são mais conhecidos por causar neoplasias, principalmente o linfoma de mediastino (BOLIN; LEVY, 2011).

O subgrupo C é formado a partir de mutações no gene *env*, mais especificamente em sequências da SU do subtipo A (HARDY JUNIOR et al., 1976). O FeLV tipo C utiliza o transportador heme FLVCR1 que é amplamente expresso em tecidos hematopoiéticos (SHALEV et al., 2009). A infecção pelo FeLV tipo C geralmente está associada a existência de anemia grave com ausência de reticulócitos, enquanto a contagem das demais células permanece dentro dos valores de referência (LINENBERGER; SHELTON, 1995).

Além dos subgrupos acima descritos, existem ainda os subgrupos FeLV-D e FeLV-T. O subgrupo FeLV-D é produto da recombinação entre FeLV-A e um retrovírus endógeno divergente do enFeLV, o ERV-DC (YUKARI ANAI et al., 2012). O FeLV-T se origina a partir de mutações no gene *env* do FeLV-A e utiliza o Pit-1 como receptor, mas necessita da presença da proteína de envelope FeLIX, codificada pelo enFeLV, para o sucesso da infecção (LAURING et al., 2002; CHIU et al., 2018). O FeLV-T apresenta tropismo por linfócitos T e induz um distúrbio imunodepressor fatal descrito como FeLV-FAIDS (LUTZ et al., 2009).

3.1.2 Transmissão e infecção

O FeLV é um vírus contagioso e por muitos anos acreditou-se que o contato do indivíduo susceptível com secreções de animais infectados era, exclusivamente, decorrente do comportamento social amigável da espécie e do compartilhamento do ambiente. No entanto, em um estudo epidemiológico realizado na América do Norte, foi encontrada associação entre gatos que apresentaram feridas ou abscessos resultantes de mordidas e a infecção por FeLV (GOLDKAMP et al., 2008). No Brasil, um estudo realizado em Santa Catarina, pelo Grupo de Patologia Veterinária da UDESC, encontrou associação para o comportamento agressivo e a infecção por FeLV (BIEZUS et al., 2019a.). Estes dados demonstram que a infecção parenteral, por inoculação de partículas vírais através de brigas, pode ser uma importante via de transmissão do vírus. A transmissão iatrogênica, principalmente via transfusão de sangue, também é uma importante forma de contágio (HARTMANN, 2006).

A principal via de infecção por FeLV ainda é a exposição oronasal a partículas do vírus presente em secreções como saliva, secreção nasal, fezes, urina e leite. Fêmeas gestantes também podem infectar seus filhotes por via transplacentária (PACITTI, 1986; WILLETT; HOSIE, 2013).

São mais suscetíveis, de maneira geral, os gatos mais jovens. Um estudo realizado por Hoover et al. (1976) testou o sucesso da infecção experimental em diversas faixas etárias e demonstrou que a suscetibilidade à infecção por FeLV diminui com o aumento da idade. Gatos recém-nascidos apresentavam viremia com desenvolvimento de doença relacionada ao FeLV 100% das vezes enquanto, somente 15% dos felinos com 4 meses a 1 ano de idade o faziam.

A afirmação que gatos mais jovens são mais susceptíveis à infecção é verdadeira também para a infecção natural, uma vez que os estudos epidemiológicos demonstram que a maioria dos felinos com infecção progressiva para FeLV possuem até 4 anos de idade (GLEICH; HARTMANN, 2009; BIEZUS et al., 2019a). Além da idade, fatores como o estado geral de saúde do gato, a carga viral e a patogenicidade do agente também influenciam no sucesso da infecção (SCHERK et al., 2013).

Uma vez que o felino é exposto ao vírus, terá início a replicação ou viremia primária que ocorre nos linfócitos e macrófagos do tecido linfoide regional para então, por meio desses, o vírus se propagar para o resto do organismo (SPARKES, 1997). Após atingir as células da medula óssea, que são de rápida replicação, uma nova fase de viremia acontecerá dentro de algumas semanas ou meses (ROJKO, 1979).

A infecção pode evoluir de diferentes formas, que vão variar de acordo com as características do próprio vírus e a capacidade imunológica do hospedeiro em controlar a viremia. A literatura difere quanto as formas de classificar o desfecho da infecção (HOOVER; MULLINS, 1991; HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; HATMANN, 2012), porém um guia recente publicado pela *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) aborda três desfechos para a infecção por FeLV: progressiva, regressiva e abortiva (LITTLE et al., 2020). Exclusivamente no âmbito experimental existe uma quarta classificação, a infecção focal, que é um desfecho com menor importância clínica, na qual a replicação viral se restringe a um tipo de órgão específico e nunca ocorre no sangue ou na medula óssea (MAJOR et al., 2010).

Um estudo recente determinou o percentual de gatos que desenvolvem cada desfecho da infecção e obteve diferentes valores para cada grupo estudado. Gatos que possuíam tutores, mesmo que mantivessem o acesso livre a rua, apresentaram maior porcentagem de infecção abortiva (11%) quando em comparação a regressiva (2%) e progressiva (0,5%). Já gatos oriundos de resgate e mantidos em abrigos coabitando com outros gatos apresentaram maior proporção de infecção regressiva (25%) e progressiva (21%), em comparação a infecção abortiva (9%). Estes dados mostram que variáveis como a maior chance de exposição ao vírus, carga viral mais elevada e estresse ambiental interferem nesta proporção (WESTMAN et al., 2019). Não foi encontrado na literatura consultada, estudos nacionais similares.

3.1.2.1 Infecção progressiva

A infecção progressiva representa o desfecho de maior importância clínica, pois os animais com este tipo de infecção apresentam maior probabilidade de adoecerem. Este desfecho é caracterizado pela ineficácia da imunidade específica em neutralizar o vírus no início da infecção. O mesmo irá replicar primeiro nos linfonodos, passando então a medula óssea e nos tecidos epiteliais de mucosas e glândulas (ROJKO, 1979; LEVY et al., 2008). Felinos com infecção progressiva permanecem virêmicos e infecciosos e sua expectativa de vida passa a ser de 3 a 4 anos (HOOVER et al., 1975; PACITTI et al., 1986).

3.1.2.2 Infecção regressiva

Outro desfecho com importância clínica é a infecção regressiva, apesar de ser pouco identificada. Acontece quando o felino infectado apresenta resposta imune eficaz, combatendo

o vírus logo no início da sua disseminação na medula óssea (HOOVER et al., 1976). Ocorre um período de viremia que dura três a seis semanas, atingindo no máximo 16 semanas, no qual os felinos podem transmitir o vírus e ao término da viremia os animais tornam-se imunes contra nova exposição (LEVY et al., 2008). Mesmo que estes animais não apresentem viremia, o vírus pode ser isolado em cultivos a partir da medula óssea infectada (MADEWELL; JARRETT, 1983).

3.1.2.3 Infecção abortiva

A infecção abortiva é comum em infecções naturais e é caracterizada pela efetividade da resposta imune celular e humoral contra o vírus, logo após a infecção e replicação inicial no tecido linfoide da região orofaríngea, sem que o felino desenvolva viremia (SYKES; HARTMANN, 2014). Geralmente são gatos que tiveram exposição oronasal a poucas partículas virais e que vão apresentar como único indicativo da infecção a produção de anticorpos contra FeLV (MAJOR et al., 2010).

3.1.3 Aspectos clínicos da infecção por FeLV

As alterações clínicas em gatos FeLV positivos são comumente encontradas quando este desenvolve a infecção progressiva e vão variar de acordo com a doença apresentada. Como já citado anteriormente, um dos fatores associados ao desenvolvimento de determinada doença é o subgrupo ao qual esse felino foi exposto, uma vez que algumas manifestações clínicas são mais prováveis em determinado subgrupo que em outro. Como por exemplo, o FeLV-A ou FeLV-B em linfomas e o FeLV-C em anemias arregenerativas como única alteração hematológica (LINENBERGER; SHELTON, 1995; BOLIN; LEVY, 2011).

O desenvolvimento de tumores está entre as doenças mais comuns. Linfomas e leucemias são rotineiramente identificados e o fibrossarcoma já teve sua associação comprovada (BESMER et al., 1986; BIEZUS et al., 2019b; CRISTO et al., 2019a, b). Além destas neoplasias, os osteocondromas também já foram descritos em gatos positivos para o FeLV, porém o grau de envolvimento e sua patogenia ainda são desconhecidos (REIS et al., 2017).

Em países desenvolvidos, foi observada diminuição da associação do linfoma com a infecção pelo FeLV. Um estudo retrospectivo realizado na Califórnia, no período de 1983 a 2003, atribuiu esta diminuição aos programas de prevenção da doença que iniciaram em 1970

(LOUWERENS, 2005). Infelizmente para o Brasil essa realidade não se aplica e assim como para o linfoma, os casos de leucemia também são fortemente associados a infecção (CRISTO et al., 2019a, b). Isso ocorre, entre outros motivos, devido ao hábito de triagem para o vírus ainda ser pouco aplicado na rotina clínica. O teste para FIV e FeLV, na maioria das vezes, é realizado como um método de comprovar a origem da doença associada, como exemplo em gatos diagnosticados com linfoma. Além disso, apesar de novos estudos terem sido realizados nos últimos anos, ainda existem poucos dados epidemiológicos e pouco se fala em prevenção destas ou de outras doenças infecciosas no país e isso reflete no baixo número de felinos vacinados (COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Outro fator importante, que mantém a associação de FeLV com linfoma e leucemia elevada no país, é o grande número de animais que tem acesso livre a rua (BIEZUS et al., 2019a; DAY et al., 2020). É um fator que aumenta a exposição dos gatos a doenças infecciosas e em consequência o número de doentes (DAY et al., 2020).

No caso das neoplasias, existem dois mecanismos utilizados para explicar a sua formação. O primeiro deles é por meio da mutagênese insercional adquirida somaticamente, que ocorre devido a inserção do material genético viral no genoma da célula do hospedeiro. A inserção acontece em áreas próximas a proto-oncogenes celulares que são ativados graças a capacidade que a região U3-LTR do FeLV possui de aumentar a transcrição desses genes levando a consequente proliferação celular descontrolada (FAN, 1977; GHOSH; FALLER, 1999; FUJINO et al., 2008). O segundo mecanismo é o de transdução retroviral, no qual sequências oncogênicas são incorporadas ao genoma viral através de um evento de recombinação. O vírus que contém o oncogene, vai infectar uma célula alvo e terá potencial para tornar esta célula tumoral (BOLIN; LEVY, 2011).

Existem Sítios de Integração Comuns (SIC) ao qual o provírus se integra ao genoma da célula do hospedeiro que foram associados ao desenvolvimento de linfomas, principalmente o proto-oncogene *c-myc*, também foram identificados os genes *flvi-1*, *flvi-2*, *fit-1*, *pim-1* e *flit-1* que podem atuar ou não em associação ao *c-myc* (FUJINO et al., 2008). Uma investigação da base genética de linfomas com origem em células T induzidos pelo FeLV, demonstrou que as inserções provirais foram mais comuns nos SIC *myc* e *flvi-2*, mas que elas podem ocorrer simultaneamente em mais de um SIC (TSATSANIS et al., 1994).

Os tipos mais comuns de linfoma associados a infecção pelo FeLV são mediastinal, multicêntrico e extranodais (SYKES; HARTMANN, 2014), geralmente de origem em células T e em menor frequência de células B (LOUWERENS, 2005). Metade dos gatos que apresentam linfoma multicêntrico e aproximadamente 80% daqueles com linfoma mediastinal

são positivos para FeLV e apresentam menos de 4 anos de idade (SYKES; HARTMANN, 2014). No Brasil, um estudo conduzido no laboratório de Patologia da UDESC, Lages, SC demonstrou que 56,6% (30/53) dos casos de linfomas avaliados estavam associados a infecção por FeLV, especialmente os mediastinais e multicêntricos (CRISTO et al., 2019b). Com relação aos linfomas extranodais, são citados em associação com o FeLV os linfomas renais, nasais, de sistema nervoso central, oculares, laríngeos e cutâneos (HARTMANN, 2006). Os sinais clínicos relacionados dependem da localização da neoplasia (MARIONI-HENRY et al., 2008; FABRIZIO et al., 2013).

A leucemia secundária ao FeLV pode ter origem em células mieloides e linfoides e está associada a prognóstico desfavorável, mesmo quando comparada ao linfoma (HARTMANN, 2006). As leucemias mieloide e linfoide podem ser agudas ou crônicas, sendo classificadas de acordo com as características citológicas dos componentes celulares da medula óssea (ADAM et al., 2009; CRISTO et al., 2019a). De maneira geral essa classificação é influenciada pelo curso clínico da doença, uma vez que as leucemias agudas, compostas predominantemente de células imaturas, apresentam comportamento mais agressivo que as leucemias crônicas, compostas por células precursoras tardias (COUTO, 2010).

Um estudo realizado no Brasil, demonstrou que 78,4% (29/37) dos casos de leucemia em gatos estavam associados a infecção por FeLV. A leucemia mieloide (56,8%, 21/37) foi o tipo com maior ocorrência no referido estudo e a maioria de curso agudo (73%, 27/37) (CRISTO et al., 2019a).

Entre as alterações clínicas mais comuns observadas nos felinos com infecção progressiva, podem ser citadas as desordens hematológicas de origem não neoplásica, principalmente citopenias (REINACHER, 1989). Uma das principais citopenias é a anemia, principalmente do tipo arregenerativa (BIEZUS et al., 2019b). Existem diversos mecanismos envolvidos no aparecimento das anemias associadas ao FeLV. Na anemia arregenerativa há a infecção primária das células tronco hematopoiéticas e infecção das células do estroma (HARTMANN, 2006; STÜTZER et al., 2010). Para as anemias regenerativas a expressão de抗ígenos na membrana dos eritrócitos leva a destruição imunomediada dessas células (HARTMANN, 2006).

As trombocitopenias também estão entre as principais citopenias (BIEZUS et al., 2019b). Além da redução no número destas células, também podem ser observadas alterações de tamanho, formato e perda da função causadas principalmente pela replicação do FeLV dentro das plaquetas (HARTMANN, 2006).

As leucopenias são causadas pela linfopenia resultante da replicação do vírus dentro dos linfócitos e atrofia tímica ou também da neutropenia. As leucopenias são menos comuns do que a anemia, porém os pacientes podem apresentar diminuição da contagem ou o comprometimento da função destas células, o que confere a capacidade imunodepressor da vírus e facilita a infecção por agentes oportunistas (REINACHER, 1989; LINENBERGER; ABKOWITZ, 1995; HARTMANN, 2006; LUTZ et al., 2009).

A infecção progressiva por FeLV também é responsável por causar, com menor ocorrência, doenças imunomediadas, distúrbios reprodutivos, síndrome do enfraquecimento do filhote e doenças neurológicas (PACITTI et al., 1986; CARMICHAEL et al., 2002; HARTMANN, 2006). Os gatos também podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como perda de peso, desidratação e linfoadenomegalia ou até mesmo serem assintomáticos (ALMEIDA et al., 2016).

O prognóstico para os gatos que desenvolvem infecção persistente é desfavorável, com redução significativa do tempo de vida quando comparado a animais negativos. Estudos demonstram que 70 a 90% destes felinos vêm a óbito até os três anos de vida (HARDY JUNIOR et al., 1976; GLEICH et al., 2009). De maneira geral o tratamento para animais com infecção progressiva por FeLV é direcionado para a alteração clínica observada no felino em questão (HARTMANN, 2006; HARTMANN, 2015). Além disso, assim que um felino é descoberto positivo para o FeLV, o mesmo deve ser mantido somente dentro de casa e isolado dos outros felinos, para que não transmita a doença e para a sua própria proteção, diminuindo então a exposição a patógenos oportunistas (SYKES; HARTMANN, 2014).

As implicações relacionadas a infecção regressiva por FeLV vem sendo discutidas no meio científico por muitos anos, seus resultados são controversos e sua existência é pouco investigada na rotina clínica, o que pode trazer consequências graves ao paciente. A principal implicação é a capacidade de reativação do provírus inserido no DNA do hospedeiro a partir de episódios de imunodeficiência, como em gatos portadores de tumores negativos na pesquisa de antígeno para FeLV e submetidos a terapia com corticosteroides (ROJKO et al., 1982; PACITTI et al., 1986). Outra implicação seria a capacidade de interação do DNA proviral com oncogenes celulares, podendo resultar em neoplasmas em felinos mais velhos que apresentaram a infecção regressiva (SYKES; HARTMANN, 2014). Vindo contra esta ideia, um estudo buscou a presença de infecção regressiva por FeLV em gatos com linfoma e não identificou evidências do provírus nas amostras de tecido tumoral e medula óssea dos gatos investigados (STÜTZER et al., 2011).

Um estudo realizado a respeito da implicação da doação de sangue de felinos com infecção regressiva por FeLV demonstrou que apesar de partículas virais infectantes não serem detectadas nas suas secreções, por serem portadores do DNA proviral estes felinos podem transmitir o FeLV por meio de transfusões e o felino receptor pode vir a apresentar viremia (NESINA et al., 2015). A possibilidade de infecção a partir da transfusão de sangue de animais regressivos, faz com que o uso de métodos diagnósticos voltados a detecção de DNA proviral seja imprescindível na triagem de candidatos à doadores de sangue.

Este desfecho da infecção também foi estudado quanto a citopenias arregenerativas em gatos negativos pelo método de ELISA (não virêmicos), sendo considerado raro nesse tipo de citopenia (STÜTZER et al., 2010).

Não foram encontrados na literatura consultada estudos que levem em consideração a expectativa de vida e o prognóstico das doenças apresentadas em gatos com infecção regressiva. Uma vez que não é rotina clínica a investigação de gatos positivos regressivos e nem sempre esta condição está relacionada a doença o seu tratamento não é necessário, exceto para os felinos com sinais clínicos (STÜTZER et al., 2011).

3.1.4 Prevenção da infecção por FeLV

Como o FeLV é responsável por alta mortalidade, se faz necessária a implementação de estratégias de prevenção. É necessário evitar que o gato tenha acesso aos fatores associados a infecção, investir na educação profissional para a disseminação do uso de testes diagnósticos e vacina e para que estes também possam atuar na conscientização dos tutores com a finalidade de identificar o maior número de animais infectados (LITTLE et al., 2020).

A vacinação é uma importante aliada na prevenção da infecção progressiva. Um estudo que encontrou associação entre gatos com ferimentos causados por mordidas e a presença de antígeno p27 no soro, também demonstrou que gatos vacinados previamente ao ferimento apresentam menores chances de serem positivos ao antígeno viral (GOLDKAMP et al., 2008).

Segundo o guia de orientação para vacinação de cães e gatos da América Latina, publicado pela *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) a vacina para FeLV é classificada como não essencial e seu uso deve ser baseado na frequência da doença observada na população. Neste caso recomenda-se que a decisão de vacinar o felino seja baseada na prevalência obtida por estudos locais sobre a infecção (DAY et al., 2020).

Como felinos jovens são mais suscetíveis a infecção que adultos, consistem na população alvo para a vacinação (LITTLE et al., 2020). No Brasil há disponível a vacina FeL-

O-Vax® LvK IV + CaliciVax® (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e a Novibac® Feline 1-HCPCh + FeLV (MSD Saúde Animal, Merck & Co., Inc.). Os gatos devem receber a primeira dose com oito semanas de vida e a segunda dose em um intervalo de três a quatro semanas (LEVY et al., 2008). A vacinação confere imunidade ao animal por pelo menos 12 meses (HOFMANN-LEHMANN et al., 1995).

3.2 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV)

3.2.1 Estrutura e genoma do vírus

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi descoberto em 1987 por Pedersen e colaboradores, na Universidade da Califórnia, que identificaram um novo retrovírus responsável por causar uma doença semelhante a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) dos humanos. Este vírus pertence ao gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e possui tropismo para linfócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e astrócitos, causando o comprometimento da ação do sistema imune do hospedeiro (SELLON; HARTMANN, 2006).

Assim como o FeLV, o material genético do FIV é composto por RNA, que ao infectar a célula hospedeira irá ser transcrito em DNA e inserido no seu genoma. Após a infecção, os genes *env*, *gag* e *pol* passarão a ser expressos na célula infectada. O gene *env* codifica para glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrânica (gp41) que darão origem ao envelope viral. O gene *gag* codifica para proteínas estruturais internas que darão origem ao nucleocapsídeo e a matriz. O gene *pol* é responsável por codificar enzimas como a transcriptase, a protease e a integrase (SYKES, 2014). Além disso também vai codificar pirofosfatase desoxiuridina (DU), essencial para a replicação viral em células que não estão em processo de divisão (LERNER et al., 1995). O FIV também possui mais dois genes acessórios, o *vif* e o *rev*, com função de infectividade viral e transporte de RNA mensageiro.

Existem cinco principais subgrupos para o FIV (A, B, C, D e E), classificados de acordo com alterações da sequência do gene *env*, sendo o subtipo B o mais prevalente no Brasil (MARTINS et al., 2008). A infecção por um subtipo não evita a infecção por outro, sendo uma condição bastante comum chamada de superinfecção. Também é possível que esse evento leve a recombinação entre os subgrupos (KYAW-TANNER et al., 1994; REGGETI; BIENZLE, 2004).

A principal célula alvo para a replicação primária deste vírus são os linfócitos T CD4+, aonde a molécula CD134 atua como receptor primário de superfície celular para a ligação da proteína gp120 presente no envelope viral (WILLET et al., 2006).

3.2.2 Transmissão e infecção

A transmissão do FIV acontece de forma horizontal ou vertical. A forma horizontal ocorre através da exposição de mucosas (oronasal e vaginal) ao vírus (OBERT; HOOVER, 2000), assim como por inoculação parenteral de partículas virais presentes na saliva ou sangue de um animal infectado (SELLON; HARTMANN, 2006). A transmissão vertical acontece da mãe para o filhote, por via pré ou pós-natal (WILLET et al., 2006). Apesar de ser mais comum no âmbito experimental, a transmissão vertical também já foi documentada em infecções naturais (MEDEIROS et al., 2012). Existem alguns fatores que vão influenciar na efetividade das diferentes formas de transmissão, como a carga viral inoculada e a virulência da cepa (LITSTER, 2014).

Diferente da infecção por FeLV que apresenta vários desfechos, a infecção por FIV é dividida em fases: aguda, subclínica e terminal. A fase aguda está relacionada a viremia primária, onde após entrar no organismo o FIV se replica em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4 +, e dentro de duas semanas já é possível de ser detectado no plasma, atingindo um pico de oito a 12 semanas após a infecção (DEL FIERRO et al., 1995; HOSIE et al., 2009; SYKES, 2014). Nesta fase ocorre a produção de anticorpos e desta maneira há supressão do vírus circulante a uma carga viral decrescente. Ocorre um decréscimo na população de linfócitos TCD4+, resultando na inversão da proporção CD4:CD8 (YAMAMOTO et al., 2007; LITTLE et al., 2020).

A infecção subclínica ou assintomática, geralmente precede a fase onde ocorre desenvolvimento de problemas imunológicos e o animal pode permanecer nesta condição por muitos anos sem apresentar sinal clínico. Nesta fase, o provírus está integrado nas células, mas não ocorre a produção de novas partículas virais. Essas representam um reservatório de infecção que não é atingido por anticorpos neutralizantes e podem ser ativadas a qualquer momento. De maneira geral, essa fase é caracterizada por baixa viremia (ISHIDA et al., 1992; SYKES, 2014). A carga plasmática do vírus é estável, mas pode haver declínio progressivo no número de linfócitos T CD4 + e CD8 + levando a próxima fase da infecção (HOSIE et al., 2009).

A última fase da infecção por FIV, chamada de terminal ou Síndrome da Imunodeficiência Felina Adquirida (AIDS felina), geralmente é fatal e comumente ocorre 7 a

9 anos após a infecção (YAMAMOTO et al., 2007; SYKES, 2014). Enquanto para o FeLV a infecção é comumente observada em gatos mais jovens, para o FIV o envelhecimento parece estar relacionado ao aumento do risco de infecção. Além do período maior de tempo que o felino está exposto ao risco de infecção, os mais velhos têm mais chance de testarem positivo devido ao período variável da fase assintomática, sendo que o felino pode permanecer nela por anos sem vir a apresentar a fase terminal (GLEICH et al., 2009; GLEICH; HARTMANN, 2009; BIEZUS et al., 2019a).

3.2.3 Aspectos clínicos da infecção por FIV

A infecção por FIV é conhecida por apresentar um curso insidioso e apesar de muitos animais morrerem antes do terceiro ano após a infecção, alguns podem desenvolver viremia persistente com prognóstico desfavorável (HARTMANN, 2011).

De maneira geral, somente na fase aguda e na fase terminal será possível observar as principais alterações clínicas. Durante a fase aguda é comum o surgimento de sinais clínicos inespecíficos, como hipertermia, linfoadenomegalia e letargia (DEL FIERRO et al., 1995; HOSIE et al., 2009; SYKES, 2014). Já a fase terminal é caracterizada por disfunção imunológica progressiva, facilitando infecções oportunistas, mielossupressão, doença neurológica e em alguns casos doenças neoplásicas (SYKES, 2014; LITTLE et al., 2020).

Entre as infecções oportunistas que frequentemente acometem os felinos, estão as infecções bacterianas da cavidade oral, infecções bacterianas e parasitárias crônicas de pele, infecções virais persistentes do trato respiratório superior, micoplasmose e toxoplasmose (SYKES, 2010).

Entre as neoplasias associadas ao FIV o mais comum é o linfoma de células B, no qual o vírus atua de maneira indireta, aumentando o potencial de transformação maligna durante a ativação de linfócitos B policlonais (CALLANAN et al., 1996). Diferente do FeLV, o FIV não tem a capacidade de carregar consigo oncogenes adquiridos das células normais durante o processo de replicação e vai induzir a formação de tumores por meio de mecanismos oncogênicos não-agudos, ou seja, com um período de latência prolongado. O que ocorre é a inserção do material genético do vírus próximo a proto-oncogenes ativando a sua expressão (MAEDA et al., 2008). Felinos com infecção por FIV apresentam de cinco a seis vezes mais chance de desenvolverem linfoma ou leucemia quando comparados com gatos não infectados (SHELTON et al., 1990; HARTMANN, 2012). Além do linfoma, a leucemia, o fibrossarcoma,

o tumor de células escamosas e o mastocitoma também foram diagnosticados em gatos com infecção por FIV, mas sua relação é incerta (MAGDEN et al., 2011).

FIV também é responsável por desencadear no organismo de gatos infectados uma resposta imune desregulada, levando a hipergamaglobulinemia. Estes anticorpos não são neutralizantes e levam a formação e deposição de complexos antígeno-anticorpo em capilares e consequentemente causam glomerulonefrite, poliartrite, uveíte e vasculite (HARTMANN, 2012).

Os sinais clínicos do FIV também vão variar de acordo com a apresentação da doença, ou a existência de infecções secundárias. Entre os sinais inespecíficos podem ser citados a linfoadenomegalia persistente e a perda de peso (HOSIE et al., 2009). Assim como para FeLV, o tratamento para FIV deve ser sintomático (HARTMANN, 2006, 2015). O prognóstico da infecção por FIV varia de acordo com a duração da fase assintomática e depende do potencial patogênico do vírus, da exposição de gatos infectados a outros patógenos e da idade no momento da infecção (GLEICH et al., 2009; RAVI et al., 2010). Caso o felino venha a desenvolver a fase terminal a chance de recuperação é pequena, porém a expectativa de vida para gatos que se mantêm na fase assintomática pode ser a mesma que para gatos não infectados (LITLLE et al., 2020).

3.2.4 Prevenção da infecção por FIV

No Brasil não existe vacina disponível para a prevenção da infecção por FIV, desta maneira a identificação e segregação dos contaminados e a restrição do acesso aos fatores associados ao retrovírus são as únicas formas de prevenção (DAY et al., 2020; LITTLE et al., 2020). O principal fator a ser evitado é a agressividade entre gatos, principalmente machos devido ao seu comportamento territorialista (GOLDKAMP et al., 2008; BIEZUS et al., 2019a).

A utilização de vacinas como método de prevenção para o FIV é dificultada devido à baixa eficiência. Um dos motivos é a grande variabilidade genética, principalmente do gene *env*. Uma das maneiras de driblar esse problema é a formulação de vacinas utilizando apenas as variantes virais que são relevantes para uma área geográfica específica (GAO et al., 1998). Existe somente uma vacina disponível comercialmente, a Fel-O-Vax FIV®, comercializada somente no Japão, Nova Zelândia e Austrália é indicada para gatos com alto risco de infecção (LITLLE et al., 2020). É uma vacina de vírus inativado, contendo os subgrupos virais A e D mais prevalentes na região, não estimulando imunidade necessária contra todos os subgrupos virais (DUNHAM et al., 2006, LEVY et al., 2008).

3.3 DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA DE FeLV E FIV

3.3.1 Diagnóstico de FeLV e FIV

Tradicionalmente esses vírus são diagnosticados pelos métodos de isolamento viral, imunofluorescência (IF) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (SELLON; HARTMANN, 2006). A maioria dos estudos epidemiológicos publicados baseiam-se no ELISA como método de diagnóstico. Esse também é o exame de escolha na rotina clínica, uma vez que apresenta maior praticidade por fornecer o resultado em minutos e pode ser realizado com amostra de sangue total, plasma ou soro. Além disso é comercializado na forma de teste rápido, estando à disposição em qualquer consultório veterinário e por se tratar de um combo possibilita diagnosticar ambos os vírus simultaneamente, detectando o antígeno p27 do FeLV circulante na corrente sanguínea com sensibilidade de 98,6% e especificidade de 98,2% (WILLETT; HOSIE, 2013) e anticorpos contra o antígeno viral p24 do FIV com sensibilidade de 93,5% e especificidade de 100% (LEVY et al., 2008).

Apesar da praticidade e da confiabilidade do resultado, o teste de ELISA possui algumas limitações. No diagnóstico do FeLV detecta animais apenas na fase de viremia primária da infecção ou com infecção progressiva, não detectando felinos que apresentaram resposta imune apropriada e que desenvolveram infecção regressiva ou abortiva (GREENE, 2006). Para o FIV, como o teste é voltado para a detecção de anticorpo, resultados falso-positivos podem acontecer em gatos vacinados e filhotes com menos de 6 meses devido a imunidade passiva transferida pela mãe infectadas ou vacinadas (SELLON; HARTMANN, 2006). Resultados falso negativos são raros, e devem-se principalmente à fase aguda da infecção, antes da produção de anticorpos específicos (ACKLEY et al., 1990; BIENZLE et al., 2004; LITTLE et al., 2011). Para o FeLV existe um período de 30 dias entre o contato do felino com o vírus e o desenvolvimento da antigenemia. Para o FIV o intervalo entre a infecção e a produção de anticorpos dura aproximadamente 60 dias (LITLLE et al., 2020).

O teste de imunofluorescência direta (IFD) para FeLV detecta antígeno viral intracelular em células como linfócitos, granulócitos e plaquetas de esfregaços de sangue ou medula óssea. O antígeno p27 livre é detectado mais precocemente e em quantidades menores quando estão livres no sangue do que o antígeno intracelular. É necessário que exista infecção na medula óssea para que a IFD resulte em positividade, o que faz com que este teste seja menos sensível que o ELISA (SELLON; HARTMANN, 2006; FIGUEIREDO; ARAÚJO JUNIOR, 2011). Para FIV a técnica empregada é a imunofluorescência indireta (IFI), que é utilizada com o intuito de

detectar anticorpos no soro. É um teste menos empregado que o ELISA apesar de apresentar valores similares de sensibilidade e especificidade (BARR et al., 1991; REID et al., 1992).

Tanto o FeLV quanto o FIV podem ser isolados em culturas de células, que poderão ser testadas por ensaios antigênicos ou detecção de RNA viral ou DNA proviral. No entanto, esse método não é realizado rotineiramente devido à baixa praticidade, uma vez que requer profissional treinado, ser de difícil realização e demorar para se obter o resultado (SELLON; HARTMANN, 2006; SYKES; HARTMANN, 2014).

Com o avanço da biologia molecular, nas duas últimas décadas a reação em cadeia de polimerase (PCR) vem sendo utilizada com maior frequência como um método de detectar estes agentes (COELHO et al., 2008, 2011). Além disso, a tipificação e análise filogenética vêm ganhando ênfase na pesquisa nacional e internacional. A técnica de PCR, voltada para detecção de DNA proviral no sangue periférico é a mais difundida (MYAZAWA; JARRETT, 1997; HERRING et al., 2001). Para o FeLV, a vantagem dessa técnica em relação ao ELISA é a capacidade de detectar o provírus antes mesmo da produção de antígeno p27, por esse motivo não é necessário que o felino esteja apresentando viremia (TORRES et al., 2005). Além disso, é de grande importância quando se suspeita de infecção regressiva em que o felino não será positivo para FeLV no ELISA e IFD (HERRING et al., 2001; HARTMANN, 2006).

Devido a existência de sequências de ácidos nucleicos relacionadas a FeLV ancestrais presentes nos genomas de gatos domésticos, fez-se necessário o desenvolvimento de técnicas que identificassem somente DNA de FELV exógeno (WILLET; WOSIE, 2013). A melhor maneira para realizar essa distinção é utilizando sequências do genoma viral que são diferentes do FeLV endógeno e altamente conservadas entre os subgrupos. Tendo isso em mente, foram desenhados *primers* baseados na região U3-LTR, sendo a principal região que se distingue da sequência de genes endógenos (JACKSON et al., 1993).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste convencional de PCR para a detecção do provírus em resultados discordantes, foi desenvolvido um nested-PCR usando pares internos e externos de *primers* baseados na região U3-LTR e no gene *gag*. Além de ser específico para o FeLV exógeno essa técnica também é eficiente, pois aumenta em 10^4 vezes o fator de amplificação se comparado ao PCR normal (MYAZAWA; JARRETT, 1997).

Além da finalidade diagnóstica, a técnica de PCR pode ser utilizada para objetivos mais refinados, como a identificação de um subtipo viral e análise filogenética de acordo com cada população em estudo. Existem diversos estudos internacionais relacionando a identificação de subgrupos virais e sua correlação com a apresentação clínica e desfecho da infecção (JARRET et al., 1978; CHEN et al., 1998; SHALEV et al., 2009; HELFER-HUNGERBUEHLER et al.,

2010; POWERS et al., 2018). Porém, não foram encontrados estudos realizados no Brasil com este enfoque. No que tange a prevalência dos subgrupos foi encontrado somente um estudo no estado de Minas Gerais, onde o único subtipo associado ao FeLV-A foi o FeLV-B (COELHO et al., 2008).

Para o FIV, o PCR servirá para confirmar se a infecção é verdadeira nos casos em que ainda não existe a produção de anticorpos ou existe influência da imunidade passiva em que o resultado será falso-positivo na pesquisa de anticorpos (SELLON; HARTMANN, 2006). Assim como para o FeLV, a nested-PCR também é utilizada para aumentar a sensibilidade e especificidade. Além do diagnóstico, a nested-PCR pode ser utilizada para amplificação de genes e posterior sequenciamento para determinação dos subgrupos virais (DUARTE et al., 2002; COELHO et al., 2008).

Apesar da alta sensibilidade da PCR, resultados falso-negativos podem ser obtidos devido à alta taxa de mutação genética que os retrovírus possuem, sendo necessária cautela na interpretação dos resultados (SYKES; HARTMANN, 2014).

Outro método bastante utilizado é a transcriptase reversa seguida de PCR (RT-qPCR), que amplifica cDNA a partir do RNA viral. Porém, assim como métodos baseados na identificação do antígeno p27 para FeLV, é provável que em infecções regressivas o resultado obtido seja negativo, pois depende da replicação viral para a sua detecção. Já relacionado ao FIV, em infecções subclínicas a viremia permanece em concentrações muito baixas, também podendo resultar em falsos-negativos (SELLON; HARTMANN, 2006; BANDE et al., 2014).

Outro método de diagnóstico que deve ser considerado é a imuno-histoquímica. Esta técnica detecta抗ígenos virais intracelulares e é um grande auxílio no diagnóstico *post mortem* de FIV e FeLV (REINACHER, 1989; JACKSON et al., 1993; SUNTZ et al., 2010; CRISTO et al., 2019a, b).

3.3.2 Prevalência de FeLV e FIV

Existem vários estudos epidemiológicos acerca da infecção dos gatos por FeLV e FIV. Devido as diferenças de sensibilidade e especificidade obtidas para cada teste e os diferentes desfechos e fases da infecção por FeLV e FIV, os resultados obtidos variam conforme o método diagnóstico utilizado (TEIXEIRA et al., 2007; COELHO et al., 2011; GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; POFFO et al., 2017). Além disso, fatores como a região geográfica e as características da população estudada também influenciam no número de animais positivos (GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012; COSTA et al., 2017;

LACERDA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). No Quadro 1 são observadas as prevalências, nos últimos 15 anos, em diferentes países e para diferentes métodos de diagnóstico.

Quadro 1 — Prevalência da infecção por FeLV e FIV em gatos de diferentes países de acordo com o método diagnóstico, no período de 2006 a 2021.

Método de diagnóstico	n	FeLV+	FIV+	FeLV+ /FIV+	Referência
Brasil					
PCR	145		4,14%		Teixeira et al., 2007
ELISA	302	0,33%	5,63%	0	Sobrinho et al., 2011
Nested-PCR	1072	47,5%			Coelho et al., 2011
IFD	1094	11,52%			Almeida et al., 2012
Nested-PCR	200	2%	4%		Lacerda et al., 2017
ELISA		1,5%	5,5%		
ELISA	485	31%	10,1%	4,4%	Costa et al., 2017
Nested-PCR	88		6,81%		
ELISA		4,54%	12,5%	2,27%	Poffo et al., 2017
ELISA	274	22,26%	5,84%	1,46%	Biezus et al., 2019 ^a
Argentina					
Nested-PCR	255	11,82%	20,34%	0,9%	Novo et al., 2016
ELISA		7,69%	21,45%		
Colômbia					
ELISA	1718		10,71%		Molina et al., 2016
Costa Rica					
ELISA	102	16,7%	8,8%		Blanco et al., 2009
México					
ELISA	227	7,5%	2,5%	0	Ortega-Pacheco et al., 2014
Estados Unidos da América					
ELISA	18038	2,3%	2,5%	0,3%	Levy et al., 2006
Canadá					
ELISA	11144	4,3%	3,2%	0,5%	Little et al., 2009
ELISA	1205	3,5%	5,5%	0,7%	Ravi et al., 2010
Zimbábue					
ELISA	100	41%			Muchaamba et al., 2014
Espanha					
ELISA	116	6%	2,6%	0	Ravicini et al., 2016
Itália					
ELISA	316	3,8%	6,6%	1%	Spada et al., 2012
Alemanha					
ELISA	17.462	3,2%	3,6%	0,2%	Gleich et al., 2009
Real time PCR	495	3%		0	Englert et al., 2012
ELISA		1,8%			

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Conforme evidenciado no quadro acima, os países desenvolvidos possuem menores prevalências para FeLV e FIV (GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; SPADA et al., 2012; RAVICINI et al., 2016). Isto ocorre devido a implementação de práticas de controle e prevenção, uma vez que o diagnóstico acontece frequentemente quando gatos saudáveis são rastreados para essas infecções (SYKES; HARTMANN, 2014). Outro exemplo são as diferenças encontradas nas prevalências das populações sadias ou doentes. Geralmente as prevalências obtidas são maiores quando animais doentes são adicionados na análise, em comparação as obtidas somente entre os animais sadios (ALMEIDA et al., 2012; COSTA et al., 2017; LACERDA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a).

4 ARTIGO 1

4.1 PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS E PERFIL HEMATOLÓGICO DOS GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA E REGRESSIVA PELO *Feline leukemia virus* (FeLV) NO PLANALTO DE SANTA CATARINA, BRASIL

4.2 RESUMO

A infecção pelo *Feline leukemia virus* (FeLV) é diagnosticado comumente pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para antígeno viral, porém o ELISA não fornece uma visão completa sobre a verdadeira prevalência da infecção. Técnicas de biologia molecular são aplicadas para diagnosticar diferentes desfechos, que são: abortivo, regressivo e progressivo. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das infecções progressiva e regressiva por FeLV, os fatores associados aos desfechos e as alterações hematológicas. Foram selecionados 384 felinos provenientes da rotina de atendimentos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do CAV-UDESC. Amostras de sangue foram submetidas ao exame hematológico, teste de ELISA para antígeno de FeLV e anticorpo de FIV e nested-PCR que amplifica a região U3-LTR e gene *gag*. Análise de regressão logística foi aplicada aos dados epidemiológicos e teste de Kruskal-Wallis One Way on Ranks e teste de Dunn's à idade e parâmetros hematológicos. A prevalência para a infecção progressiva (FeLV⁺P) foi 34,4% (95%IC: 29,6-39,1%), para a infecção regressiva (FeLV⁺R) foi 10,4% (95%IC: 7,4-13,4%). Gatos sem raça definida e machos tiveram 2,8 a 3 vezes mais chance de pertencerem ao grupo FeLV⁺P. Gatos coinfetados com FIV tiveram 4,8 vezes mais chance de pertencerem ao grupo FeLV⁺R. Animais do grupo FeLV⁺P e FeLV⁺R apresentaram, principalmente, trombocitopenia (56,6% e 38,2%), anemia arregenerativa (32,8% e 23,5%) e linfopenia (33,6% e 20,6%). A concentração de hemoglobina, volume globular (VG), contagem de plaquetas, linfócitos e eosinófilos nos grupos FeLV⁺P, FeLV⁺R apresentaram menores medianas que o grupo controle. A contagem de eritrócitos e eosinófilos tiveram diferença estatística entre os três grupos, com menores medianas em relação ao controle e FeLV⁺P em relação ao FeLV⁺R. Ainda, na mediana o VGM e a contagem de neutrófilos bastonetes foram maiores para FeLV⁺P que FeLV⁺R. Os resultados demonstram elevada prevalência FeLV, fatores assimilares associados aos desfechos da infecção e alterações hematológicas mais frequentes e graves associadas a infecção progressiva.

Palavras-chaves: medicina felina, retrovírus, epidemiologia, anemia, trombocitopenia.

4.3 INTRODUÇÃO

Feline leukemia virus (FeLV) é um dos agentes infeciosos mais comuns nos gatos, apresenta distribuição mundial e prevalências diferentes de acordo com a região geográfica e características da população estudada (GLEICH et al., 2009; HARTMANN, 2012; MUCHAAMBA et al., 2014; NOVO et al., 2016; BIEZUS et al., 2019a). *Feline immunodeficiency virus* (FIV) é o principal diagnóstico diferencial do FeLV e ambos são rotineiramente diagnosticados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), apresentados na forma de teste rápido que para o FeLV detecta a proteína p27 e para o FIV anticorpos, geralmente, contra a proteína estrutural p24 (HARTMANN et al., 2001).

Uma das alternativas para o diagnóstico destas retrovíroses é a reação em cadeia de polimerase (PCR), que detecta o provírus nas células do hospedeiro por meio da amplificação de sequências conservadas dos vírus (MIYAZAWA; JARRET, 1997; ARJONA et al., 2007). Para o FeLV, este método resulta em prevalências maiores que as obtidas no ELISA e se utilizado em associação à detecção de antígeno viral, permite determinar um maior número de desfechos para a infecção. Para o FIV, as prevalências obtidas pela PCR geralmente são inferiores e isso ocorre principalmente devido a depleção dos linfócitos CD4+ durante a fase crônica da doença, fazendo com que a quantidade de DNA viral seja indetectável (ENGLERT et al., 2012; NOVO et al., 2016; LACERDA et al., 2017; POFFO et al., 2017).

Além de obter a verdadeira prevalência para a infecção por FeLV, a importância de estudar os diferentes métodos de diagnóstico está nos desfechos distintos que a infecção pode cursar. Existem três classificações utilizadas comumente para a infecção pelo FeLV, que são: progressiva, regressiva e abortiva (LITTLE et al., 2020). A primeira é caracterizada por resposta imune ineficaz contra o vírus e é facilmente identificada na rotina clínica. Felinos que apresentam viremia persistente, terão resultados positivos no ELISA e na PCR. Para a segunda, o vírus é combatido no início da sua disseminação na medula óssea e não ocorre a viremia persistente, portanto, somente o provírus será detectado nas células do hospedeiro que resultará em positivo na PCR. A infecção abortiva, apesar de ocorrer em infecções naturais, terá como único indicativo a produção de anticorpos contra FeLV devido a resposta imune eficaz logo após a replicação primária do vírus no tecido linfoide regional, impedindo qualquer prejuízo à saúde do animal (HOOVER et al., 1975; PACITTI et al., 1986; HARTMANN, 2012; HARTMANN, 2017; LITTLE et al., 2020).

Por se inserirem no material genético de células precursoras da medula óssea, replicar em células de defesa e possuir diversos mecanismos mielo e imunodepressores, tanto a infecção

por FeLV quanto por FIV foram associadas a alterações clínicas como o linfoma e a leucemia, desordens hematológicas e imunodeficiência (HOOVER et al., 1975; OGILVIE et al., 1988; REINACHER, 1989; SHEETS et al., 1993; LUTZ et al., 2009; BIEZUS et al., 2019b; CRISTO et al. 2019a, b). As alterações hematológicas, sejam elas de origem neoplásica ou não, são muito descritas em gatos infectados por estes retrovírus (GLEICH et al., 2009; HARTMANN, 2012). Entre elas podem ser citadas principalmente as citopenias, sendo a anemia arregenerativa a mais comum para FeLV (BIEZUS et al., 2019b).

Tendo em vista a escassez de estudos que avaliam os fatores epidemiológicos e as alterações hematológicas que podem estar associadas aos diferentes desfechos da infecção para FeLV, o objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das infecções progressiva e regressiva por FeLV em gatos do Planalto Catarinense, determinar os fatores associados aos desfechos da infecção e as alterações hematológicas apresentadas, considerando a infecção por FIV como um diagnóstico diferencial.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Amostragem

A amostra foi composta por 384 gatos, sadios ou doentes, que fizeram parte da rotina de atendimentos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) durante o período de novembro de 2015 a dezembro de 2019. Destes animais, 274 fizeram parte de um estudo epidemiológico prévio que utilizou o método de ELISA para a detecção do anticorpo contra p24 do FIV e antígeno p27 do FELV, com o intuito de obter a prevalência e os fatores associados para a infecção por estes retrovírus no Planalto Catarinense (BIEZUS et al., 2019a).

O tamanho da amostra foi calculado utilizando o *software Foundation for Statistical Computing* (Package EpiCalc, Vienna, Austria), por meio da fórmula $n = ZxZ [P(1-P)] / D^2$, de amostragem aleatória simples para populações infinitas, aonde Z se refere ao multiplicador (1,96) obtido através do intervalo de confiança desejado (95%), com base na distribuição normal. Sendo P a prevalência esperada de 50% e D o erro máximo aceitável na estimativa (0,05) (THRUSFIELD, 2007). Desta maneira, o número mínimo de animais a serem amostrados é de 384 gatos. Para a inclusão do felino neste estudo os tutores foram contatados presencialmente ou por telefone, convidados a participar do estudo e assinaram um "Termo de consentimento livre e esclarecido" (Apêndice A).

4.4.2 Obtenção e processamento das amostras de sangue

Amostras de sangue, entre 3 e 5 mL, de todos os animais foram obtidas por venopunção jugular acondicionadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante e tubos sem anticoagulante para separação do soro. As amostras obtidas foram encaminhadas, imediatamente após a colheita, ao Laboratório de Patologia Clínica do HCV/UDESC para a realização do hemograma, obtenção do soro e separação das alíquotas.

Para avaliação hematológica foram confeccionadas extensões sanguíneas e coradas com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). A determinação do volume globular foi realizada pela técnica do microhematócrito. A contagem total de eritrócitos, leucócitos e a dosagem de hemoglobina foi realizada em contador automático SDH-3 Vet (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Para obtenção do soro sanguíneo os tubos foram submetidos a centrifugação a 2000g por 10 minutos. Cada amostra foi dividida em quatro alíquotas de 0,5 a 1 mL e acondicionadas em microtubos de 1,5mL. Duas das alíquotas continham sangue total com EDTA e duas continham o soro obtido. As alíquotas foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

4.4.3 Diagnóstico da infecção por FeLV e diferencial para FIV

As amostras de sangue de todos os animais foram testadas individualmente por ELISA e para a detecção do DNA proviral do FeLV por meio de nested-PCR. Para o teste de ELISA foi utilizado o *kit* SNAP FIV/FeLV Combo Test® (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, Estados Unidos) e três gotas de soro de cada animal, conforme a orientação do fabricante.

Para a nested-PCR foram utilizadas as alíquotas contendo sangue total e EDTA armazenadas a -80°C. As alíquotas foram mantidas a temperatura ambiente até o seu descongelamento e então homogeneizadas por agitação vibracional por 30 segundos. Foram primeiramente submetidas à extração de DNA por meio de *kit* GeneElute™ Blood Genomic DNA (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) conforme orientação do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) e diluído para manter-se à concentração de 20ng/µL a 100ng/µL. As amostras de DNA extraídas foram mantidas refrigeradas a -20°C até a confecção da nested-PCR.

A nested-PCR foi realizada conforme a técnica adaptada de Miyazawa e Jarret (1997). O DNA proviral do FeLV foi amplificado com base na região U3 LTR e o gene *gag* do FeLV

do subgrupo A. Os pares de *primers* U3-F (1): 5'-ACAGCAGAAGTTCAAGGCC-3' e G-R (1): 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3' proveniente da região U3 LTR e do gene *gag* foram preparados como *primers* externos para a primeira amplificação. Os *primers* U3-F (2): 5'-GCTCCCCAGTTGACCAGACT-3' e G-R (2): 5'-GCTTCGGTACCAAACCGAAA-3' proveniente da região U3 LTR e do gene *gag* foram preparados como *primers* internos para a segunda amplificação.

Para preparo do *mix* da primeira reação adicionaram-se 1 μ L do DNA extraído [20-100ng/ μ L], 2 μ L do primer *forward* [10 μ M], 2 μ L do primer *reverse*, 1 μ L do mix dNTP [10mM] (dNTP Set, 100mM PCR Grade; Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) e 28,75 μ L de água livre de nucleases. Também foram adicionados 10 μ L de tampão de ração (5X Green Go Taq $^{\circledR}$), 5 μ L da solução de cloreto de magnésio [25mM] e 0,25 μ L de Taq DNA polimerase [5U/ μ L] fornecidos pelo *Kit GoTaq $^{\circledR}$ G2 Hot Start Polymerase* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). As condições utilizadas para a reação em termociclador *LifePro Thermal Cycler* (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, província de Zhejiang, China) foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de anelamento a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a segunda reação, 1 μ L do produto da primeira reação foi submetido as mesmas condições de tempo e temperatura, à exceção do anelamento, que para os *primers* internos foi de 51°C.

Para todos os ensaios foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último composto por água ultrapura, livre de DNase. O controle positivo consistiu em DNA proveniente de uma amostra de sangue de um felino testado positivo para FeLV por meio de nested-PCR, cedida pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFGRS.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5%, pela mistura do produto de PCR com *GelRed $^{\circledR}$ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc., Fremont, Califórnia, Estados Unidos). Um padrão de massa molecular de DNA de 1Kb (DNA Ladder, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituânia) foi utilizado para confirmar da amplificação dos segmentos de interesse que foi visualizado mediante exposição à luz ultravioleta. Amplicons com tamanho próximo a 770pb e 600pb foram consideradas positivas para a primeira e segunda reação, respectivamente.

4.4.4 Determinação dos desfechos da infecção por FeLV e a coinfecção por FIV

Para a infecção por FeLV os gatos foram classificados quanto a dois possíveis desfechos: infecção progressiva, para os gatos positivos para FeLV por meio de ELISA e nested-PCR; infecção regressiva, para os gatos positivos para FeLV por meio de nested-PCR e negativos no ELISA (HARTMANN, 2012). Gatos com amostras de soro positivas para o anticorpo contra a proteína p27 do FIV no ELISA, foram considerados coinfetados por FIV. Na presença de resultados discordantes uma segunda alíquota de sangue total foi submetida à extração de DNA e nested-PCR para a confirmação do resultado.

4.4.5 Colheita dos dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos foram obtidos por meio de questionários (Apêndice B) realizados durante o atendimento clínico dos felinos provenientes da rotina do HCV. Foram avaliadas as seguintes variáveis: raça, gênero, estado reprodutivo, idade, acesso à rua, coabitação com gatos, agressividade, vacinação e estado de saúde.

Quanto a raça, os felinos foram classificados como sem raça definida (SRD) ou com sua raça específica; quanto ao estado reprodutivo foram classificados em inteiros ou castrados; quanto a idade, em meses de vida; se possuíam acesso à rua ou não; se coabitavam ou não com outros gatos; quanto a presença ou não de comportamento agressivo mediante outros gatos; com relação ao protocolo vacinal foram obtidos dados quanto a utilização vacina para o FeLV e a sua frequência (anual, bienal, esporadicamente); com relação ao estado de saúde foram classificados em sadios e doentes, e para o último caso, obtido o diagnóstico.

4.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram distribuídos em tabelas de contingência no software *Excel*. Quanto aos métodos de diagnóstico de FeLV, a análise de concordância entre ELISA e nested-PCR foi realizada por meio do teste Kappa de Cohen. A concordância foi classificada e denominada de acordo com Landis e Koch (1977): valores do índice Kappa < 0 = nenhuma concordância; valores entre 0 - 0.19 = baixa concordância; valores entre 0.20 - 0.39 = regular concordância; valores entre 0.40 - 0.59 = moderada concordância; valores entre 0.60 - 0.79 = substancial concordância; valores entre 0.80 - 1.00 = alta concordância.

Para análise das variáveis epidemiológicas foram formados três grupos: gatos infectados pelo FeLV com infecção progressiva (FeLV⁺ P); gatos infectados pelo FeLV com infecção regressiva (FeLV⁺ R); e gatos negativos para FeLV (FeLV⁻). Dois modelos estatísticos foram construídos com o objetivo de testar a hipótese de associação entre os desfechos da infecção por FeLV e as informações específicas do hospedeiro. Foi aplicada a análise de regressão logística, onde foram analisadas como variáveis univariadas o sexo, o estado reprodutivo, o acesso à rua, a coabitação com gatos, a agressividade, a vacinação para o FeLV e a coinfecção com FIV. Todos os fatores foram testados para a colinearidade e nenhuma correlação foi encontrada. As variáveis independentes foram então submetidas ao teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Todas as variáveis que apresentaram $p \leq 0,20$ foram consideradas para a análise multivariada e o método aplicado foi a análise de regressão logística multinomial. A interação entre as variáveis no modelo final foi avaliada a um nível de significância de $\alpha=0,05$. O software estatístico utilizado foi o IBM® SPSS® Statistics, versão 25.

Para a idade, foi utilizada estatística descritiva e a diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis One Way on Ranks e teste de Dunn's, a um nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando o programa Sigma Plot 12.0.

Para a avaliação das variáveis hematológicas, os animais com coinfecção entre FeLV e FIV foram considerados em dois grupos distintos (FeLV⁺P e FIV⁺; FeLV⁺R e FIV⁺). No grupo FeLV⁻, os animais doentes e/ou coinfetados por FIV foram excluídos da análise e o grupo foi considerado como Controle para a comparação entre os grupos. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis One Way on Ranks e teste de Dunn's, a um nível de significância $\alpha=0,05$, utilizando o programa Sigma Plot 12.0. Grupos com menos de 30 animais não foram considerados para esta análise estatística.

4.4.7 Comissão de Ética no Uso de Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 5806100918).

4.5 RESULTADOS

A prevalência total aparente para a infecção pelo FeLV foi de 45,6% (95% IC 40,6-50,6%). O número de positivos obtido em cada método de diagnóstico e o nível de concordância podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 — Análise de concordância entre os métodos de diagnóstico nested-PCR e ELISA para a infecção pelo FeLV em gatos.

Métodos diagnósticos		Nested-PCR		Total
		FeLV positivo	FeLV negativo	
ELISA	FeLV positivo	132	3	135
	FeLV negativo	40	209	249
Total		172	212	384
		KAPPA=0,77 (substancial)		

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A prevalência obtida para a infecção progressiva (FeLV⁺P) foi de 34,4% (95% IC: 29,6-39,1%), para a infecção regressiva (FeLV⁺R) 10,4% (95% IC: 7,4-13,4%), para FeLV⁺P coinfectados com FIV 2,6% (95% IC: 1,2-4,0%) e FeLV⁺R coinfectados com FIV 1,5% (95% IC: 0,3-2,7%).

Apresentaram resultados discordantes 0,8% (3/384) amostras, que testaram positivo para o ELISA, porém negativo para a nested-PCR e não puderam ser classificadas em nenhum grupo. Estas amostras eram provenientes de gatos sem raça definida (SRD) e castrados, 66,7% eram machos e 33,3% fêmeas, 66,7% tinham acesso livre à rua, coabitavam com outros gatos e eram agressivos. Somente 33,3% recebiam vacinas que era aplicada esporadicamente e não incluía vacina para FeLV e 66,7% estavam doentes no momento do diagnóstico. A idade média desses animais foi de 76,7 ($\pm 59,5$) meses, com idade mínima de 8 meses e máxima de 114 meses. Os dados epidemiológicos obtidos, descritos para cada grupo, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 — Análise estatística descritiva de uma população hospitalar de gatos (n=381) do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando os desfechos progressivo (FeLV⁺P) e regressivo (FeLV⁺R) da infecção por FeLV.

Variáveis		FeLV ⁺ P n=132	FeLV ⁺ R n=40	FeLV ⁻ (n=209)
Raça	Raça pura	6 (4,6)	6 (15,0)	22 (10,5)
	SRD	126 (95,5)	34 (85,0)	187 (89,5)
Sexo	Macho	82 (62,1)	19 (47,5)	74 (35,4)
	Fêmea	50 (37,9)	21 (52,5)	135 (64,6)
Castração	Não	66 (50,0)	19 (47,5)	107 (51,2)
	Sim	66 (50,0)	21 (52,5)	101 (48,3)
	NI	0	0	1 (0,5)
Acesso à rua	Não	31 (23,5)	13 (32,5)	76 (36,4)
	Sim	101 (76,5)	27 (67,5)	133 (63,6)
Coabitacão com gatos	Não	41 (31,1)	17 (42,5)	79 (37,8)
	Sim	88 (66,7)	22 (55,0)	129 (61,7)
	NI	3 (2,3)	1 (2,5)	1 (0,5)
Agressividade	Não	61 (46,2)	19 (47,5)	120 (57,4)
	Sim	54 (40,9)	20 (50,0)	84 (40,2)
	NI	17 (12,9)	1 (2,5)	5 (2,4)
Vacina para FeLV	Não	118 (89,4)	37 (92,5)	181 (86,6)
	Anual	8 (6,1)	3 (7,50)	15 (7,2)
	Esporádica	3 (2,3)	0	4 (1,9)
	NI	3 (2,3)	0	9 (4,3)
Estado de saúde	Sadio	19 (14,4)	18 (45,0)	82 (39,2)
	Doente	113 (85,6)	22 (55,0)	127 (60,8)
Infecção por FIV	Sim	10 (7,5)	6 (15,0)	7 (3,3)
	Não	122 (92,4)	34 (85,0)	202 (96,6)

FeLV: vírus da leucemia felina; SRD: sem raça definida; NI: não informado; FeLV⁺ P: positivos para FeLV e com infecção progressiva; FeLV⁺ R: positivos para FeLV e com infecção regressiva; FeLV⁻: negativo para FeLV; FIV: vírus da imunodeficiência felina; Valores entre parênteses representam percentagem. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Com relação a idade, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos. A análise dos dados pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3 — Distribuição da idade dos gatos (n=381) de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando os desfechos da infecção para FeLV.

Grupos	Idade (meses)					Valor de <i>p</i>
	Média	Mediana	25%	75%	Vs. Controle	
FeLV ⁺ P	37,6 ($\pm 28,2$)	30,0	16	59	0,945	0,935
FeLV ⁺ R	44,2 ($\pm 41,2$)	30,5	12,7	60	0,988	
FeLV ⁻	48,7 ($\pm 50,1$)	24	12	72		

FeLV: vírus da leucemia felina; FeLV⁺ P: positivos para FeLV com infecção progressiva; FeLV⁺ R: positivos para FeLV com infecção regressiva; FeLV⁻: negativos para FeLV. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na análise univariada, foi obtida associação significativa ($p \leq 0,05$) para FeLV⁺ P o gênero masculino e o acesso à rua; para FeLV⁺R a coinfecção com FIV conforme está demostrada na Tabela 4.

Tabela 4 — Razão de chance e valores de p estimados pela análise univariada dos fatores associados ao desfecho progressivo (FeLV⁺P) e regressivo (FeLV⁺R) para a infecção por FeLV em gatos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil.

Fator associado	Univariada FeLV⁺P			Univariada FeLV⁺R	
	Valor de p	OR (IC:95%)	Valor de p	OR (IC:95%)	
Raça	Pura	-	-	-	-
	SRD	0,079	2,5 (0,97-6,26)	0,584	0,7 (0,25-1,76)
Gênero	Macho	<0,001	2,7 (1,90-4,7)	0,204	1,6 (0,83-3,26)
	Fêmea	-	-	-	-
Castração	Sim	-	-	-	-
	Não	0,851	0,9 (0,60-1,45)	0,756	0,8 (0,43-1,67)
Vacina para FeLV	Sim	-	-	-	-
	Não	0,965	1,1 (0,51-2,39)	0,983	1,2 (0,35- 4,38)
Acesso à rua	Sim	0,053	1,7 (1,02-2,75)	0,998	1,1 (0,52-2,2)
	Não	-	-	-	-
CoabitAÇÃO com gatos	Sim	0,215	1,4 (0,87- 2,2)	0,535	0,8 (0,38-1,5)
	Não	-	-	-	-
Agressividade	Sim	0,377	1,3 (0,8-2,0)	0,321	1,5 (0,76-2,99)
	Não	-	-	-	-
Coinfecção com FIV	Sim	0,136	2,4 (0,88- 6,38)	0,008	5,1 (1,61-16,07)
	Não	-	-	-	-

OR: Odds ratio ou razão de chance; IC: intervalo de confiança. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na análise multivariada gatos SRD e machos tiveram maior chance de apresentar o desfecho progressivo, enquanto, gatos coinfetados com FIV tiveram maiores chances de apresentar o desfecho regressivo ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 — Razão de chance e valores de *p* estimados pela análise de regressão logística multinomial para fatores associados ao desfecho progressivo (FeLV⁺P) e regressivo (FeLV⁺R) para a infecção por FeLV em gatos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil.

Fator associado	Multivariada FeLV⁺P			Multivariada FeLV⁺R	
	Valor de <i>p</i>	OR (IC:95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC:95%)	
Raça	Pura	-	-	-	-
	SRD	0,037	2,8 (1,06-7,30)	0,430	0,7 (0,24-1,83)
Gênero	Macho	<0,001	3,0 (1,89-4,77)	0,351	1,4 (0,69-2,86)
	Fêmea	-	-	-	-
Acesso à rua	Sim	0,218	1,4 (0,82-2,32)	0,897	0,9 (0,45-2,01)
	Não	-	-	-	-
Coinfecção com FIV	Sim	0,384	1,6 (0,56-4,41)	0,009	4,8 (1,48-15,81)
	Não	-	-	-	-

OR: Odds ratio ou razão de chance; IC: intervalo de confiança. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Com relação ao estado de saúde dos gatos, no grupo FeLV⁺P, para os doentes que apresentaram somente infecção por FeLV [92,9% (105/113)], 74,3% (78/105) desenvolveram alterações clínicas relacionadas ao retrovírus como linfoma (38,5%), palidez de mucosa em decorrência da anemia (24,4%), leucemia (17,9%), infecções bacterianas concomitantes (9,0%), infecção viral concomitante pelo vírus da peritonite infecciosa felina (PIF) (6,4%) e o complexo gengivite estomatite felina (CGEF) (3,8%). As doenças não correlacionadas ao FeLV apresentadas pelos felinos no grupo FeLV⁺P [25,7% (27/105)], foram traumas (37,0%), gastroenterites (33,4%), outras neoplasias (14,8%), dermatite alérgica (7,4%) e a doença do trato urinário inferior dos felinos (DTUIF) (7,4%). Aqueles doentes do grupo FeLV⁺P e coinfetados por FIV [7,1% (8/113)] apresentaram CGEF (37,5%), linfoma multicêntrico (25,0%), leucemia (12,5%), pododermatite linfoplasmocitária (12,5%) (BIEZUS et al., 2020) e abortamento com maceração fetal (12,5%).

Para os doentes do grupo FeLV⁺R que apresentaram infecção somente por FeLV [81,8% (18/22)], 61,1% (11/18) tinham alterações clínicas relacionadas ao retrovírus como palidez de mucosas em decorrência da anemia arregenerativa (45,4%), leucemia (18,2%), linfoma (9,1%), PIF (9,1%), CGEF (9,1%), micoplasmose felina (9,1%). As doenças não correlacionadas ao FeLV apresentadas pelo grupo FeLV⁺R [38,9% (7/18)], foram a DTUIF (57,1%), outras neoplasias (28,6%) e gastroenterite (14,3%). Tinham coinfecção por FIV 18,2% (4/22) dos animais doentes do grupo FeLV⁺R, onde 75,0% apresentaram doenças não correlacionadas aos retrovírus como a DTUIF, outras neoplasias e trauma. Somente um felino coinfetado com FIV

(25,0%) apresentou doença que pode estar relacionada ao FeLV, a coinfecção com os agentes da rinotraqueite infecciosa felina.

Os animais doentes que apresentaram resultados discordantes no ELISA e PCR foram diagnosticados um com linfoma multicêntrico e outro com fibroma em laringe.

A frequência das alterações hematológicas observadas em cada grupo pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6 — Frequência das alterações hematológicas dos gatos com infecção progressiva por FeLV (FeLV⁺P), regressiva (FeLV⁺R), FeLV⁺P coinfetados com FIV (FeLV⁺P e FIV⁺) e FeLV⁺R coinfetados com FIV (FeLV⁺R e FIV⁺) oriundos de uma população hospitalar.

Alterações Hematológicas	FeLV ⁺ P n=122; (%)	FeLV ⁺ R n=34; (%)	FeLV ⁺ P e FIV ⁺ n=10; (%)	FeLV ⁺ R e FIV ⁺ n=6
Anemia arregenerativa	N.N	28 (22,9)	3 (8,8)	2 (20,0)
	M.N	7 (5,6)	4 (11,8)	2 (33,3)
	N.H	3 (2,5)	-	-
	M.H	2 (1,6)	1 (2,9)	-
Anemia regenerativa	N.N.	-	-	-
	M.N	4 (3,3)	-	1 (10,0)
	N.H	-	-	-
	M.H	2 (1,6)	-	-
Trombocitose		1 (0,8)	-	1 (10,0)
Trombocitopenia		69 (56,6)	13 (38,2)	6 (60,0)
Leucocitose		23 (18,8)	6 (17,6)	1 (10,0)
Leucopenia		25 (20,5)	3 (8,8)	5 (50,0)
Neutrofilia	D. E. R.	12 (9,8)	-	1 (16,7)
	Madura	13 (10,7)	6 (17,6)	1 (16,7)
Neutropenia		26 (21,3)	2 (5,9)	3 (30,0)
Linfocitose		16 (13,1)	1 (2,9)	1 (10,0)
Linfopenia		41 (33,6)	7 (20,6)	5 (50,0)
Eosinofilia		10 (8,2)	2 (5,9)	-
Basofilia		14 (11,5)	3 (8,8)	-
Monocitose		4 (3,3)	2 (5,9)	-

N.N.: normocítica e normocrômica; N.H.: normocítica e hipocrômica; M.N.: macrocítica e normocrômica; M.H.: macrocítica e hipocrômica; D.E.R: desvio à esquerda regenerativo.Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As citopenias foram encontradas em mais de uma linhagem celular para 46,7% (57/122) dos casos do grupo FeLV⁺P, 23,5% do grupo FeLV⁺R, 70,0% do grupo FeLV⁺P e FIV⁺ e 50,0% do grupo FeLV⁺R e FIV⁺. Em todos os casos, os hemogramas classificados como anemia arregenerativa apresentaram a contagem de reticulócitos inferior a 60.000/ μ L.

Alterações morfocelulares também foram observadas. Eritrócitos nucleados em diferentes fases de maturação foram visualizados em 22,5% dos casos de anemia arregenerativa no grupo FeLV⁺P. Plaquetas reativas, em um caso de trombocitose do grupo FeLV⁺P e FIV⁺ e em 10,2% dos casos de trombocitopenia no grupo FeLV⁺P e 15,4% no grupo FeLV⁺R.

Para os animais com neutrofilia e desvio à esquerda regenerativo do grupo FeLV⁺P, em 41,7% dos casos o desvio abrangia até a linhagem mielocítica, 25,0% até a metamielocítica e 33,3% até neutrófilos bastonetes. No grupo FeLV⁺R e FIV, o desvio abrangia até a linhagem mielocítica. Corpúsculo de Döhle e neutrófilos tóxicos foram observados em 58,3% e 33,3%, respectivamente, dos casos de neutrofilia com desvio regenerativo à esquerda e em 23,1% e 11,5%, respectivamente, dos casos de neutropenia do grupo FeLV⁺P. Também foram observados concomitantemente em um caso de neutropenia no grupo FeLV⁺P e FIV⁺ e somente o Corpúsculos de Döhle em 23,1% dos casos de neutrofilia madura no grupo FeLV⁺P e no caso do grupo FeLV⁺R e FIV⁺.

Nos casos em que a linfocitose foi relatada, linfócitos pleomórficos estavam presentes em 68,8% dos hemogramas no grupo FeLV⁺P e no caso do grupo FeLV⁺P e FIV⁺. Linfócitos reativos também foram observados em associação a linfocitose em 43,8% e em associação a linfopenia em 14,6% dos casos do grupo FeLV⁺P e 42,9% dos casos do grupo FeLV⁺R. O resultado obtido na análise estatista da comparação entre os grupos pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 — Análise estatística das variáveis hematológicas dos gatos com infecção progressiva por FeLV (FeLV⁺P), regressiva (FeLV⁺R) e FeLV e FIV negativos e saudáveis (Controle) oriundos de uma população hospitalar.

Variável hematológica	Controle n=80		FeLV ⁺ P n=122			FeLV ⁺ R n=34		FeLV ⁺ P vs. FeLV ⁺ R	
	Md	Variação (25-75%)	Md	Variação (25-75%)	p (vs. controle)	Md	Variação (25-75%)	p (vs. controle)	P
Eritrócitos (x10 ⁶ /µL)	8,7	8-9,3	5,6	2,7-7,9	<0,001 ^a	7,8	5,8-8,9	0,003 ^a	0,01 ^a
Hemoglobina (g/dL)	12,3	11,6-13,2	8,8	4,6-11,7	<0,001 ^a	11,7	8,2-12,6	<0,001 ^a	0,068
VG (%)	39	36-42	28,5	15-37	<0,001 ^a	36	26-39	<0,001 ^a	0,106
VGM (fL)	44,5	43,1-46,3	49,5	45,5-55,4	<0,001 ^a	45,0	41,1-49,5	0,681	0,006 ^a
CHCM (g/dL)	31,2	30,5-32,8	31,8	30,3-34,2	0,480	32,0	30,2-34	0,732	0,769
Plaquetas (x10 ³ /µL)	378	306-454,7	252	156,5-360	<0,001 ^a	333	219-429	0,020 ^a	0,046
Leucócitos (x10 ³ /µL)	10,4	8,6-14,5	10,6	6-17,8	0,711	10,4	8,8-15,7	0,71	0,674
N. Bast. (x10 ³ /µL)	0	0	0	0-0,1	<0,001 ^a	0	0	0,012	0,078
N. Seg. (x10 ³ /µL)	5,9	4,2-8,2	6,7	2,9-12	0,812	6,3	3,5-11,5	0,463	0,458
Linfócitos (x10 ³ /µL)	3,3	2,4-4,8	1,8	0,9-4,1	<0,001 ^a	2,6	1,5-3,8	0,041 ^a	0,125
Eosinófilo (x10 ³ /µL)	0,8	0,5-1,2	0,1	0-0,5	<0,001 ^a	0,5	0,2-0,9	0,011 ^a	0,003 ^a
Basófilos (x10 ³ /µL)	0	0	0	0	0,440	0	0	0,381	0,692
Monócitos (x10 ³ /µL)	0,1	0-0,3	0,1	0-0,3	0,10	0,6	0-0,3	0,910	0,703

Md.: mediana; Vs.: versus; VG: volume globular; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; N.: neutrófilos; Bast.: bastonetes; Seg.: segmentados; E.: Eritrócitos; PTP: proteína total plasmática; ^a: indica diferença significativa. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.6 DISCUSSÃO

A prevalência total de animais infectados por FeLV neste estudo é alta quando comparada com estudos que também utilizaram a detecção do próvirus e do antígeno viral p27 em outros países como a Argentina e a Alemanha, onde as prevalências obtidas foram de 11,8% e 3%, respectivamente (ENGLERT et al., 2012; NOVO et al., 2016). No primeiro caso, apesar do estudo ter sido conduzido em animais doentes, suspeitos de estarem infectados por FIV ou FeLV, somente gatos acima de 2 anos foram incluídos (NOVO et al., 2016). Esta seleção exclui uma faixa etária importante com suscetibilidade ao vírus (HOOVER et al., 1976; GLEICH; HARTMANN, 2009; BIEZUS et al., 2019a), dessa maneira causando provável diminuição na prevalência. No segundo caso, a amostra foi selecionada de maneira semelhante ao presente estudo e a diferença na prevalência obtida se deve à ausência de estratégias de controle para a doença na região analisada, ao contrário do que se observa na Alemanha, que após a

implementação de programa de detecção, remoção e vacinação dos gatos obteve decréscimo da prevalência para FeLV (GLEICH et al., 2009).

Quando comparada aos estudos semelhantes realizados no Brasil, a prevalência total para FeLV é superior à obtida no estado da Bahia (3%) e se assemelha ao estado de Minas Gerais (47,5%) (COELHO et al., 2008; LACERDA et al., 2017). O primeiro caso se deve a diferença na seleção da amostra, onde foram priorizados gatos saudáveis (LACERDA et al., 2017). Quando aplicada esta estratificação da amostra, as prevalências tendem a ser inferiores nos felinos saudáveis quando em comparação aos doentes (MUCHAAMBA et al., 2014; BIEZUS et al., 2019a). No segundo caso, a amostra foi selecionada de maneira similar ao presente estudo e as prevalências semelhantes se devem a um conjunto de fatores que descrevem o hábito de vida da população de felinos no país.

Sabe-se que a dinâmica da infecção por FeLV depende do tamanho da população hospedeira e do nível de contato entre os gatos (FROMONT et al., 1998) e atualmente nas regiões Sudeste e Sul do Brasil estima-se que 15,2% e 21,2%, respectivamente, dos domicílios tenham ao menos um gato (IBGE, 2020) e o número de gatos ferais é incerto. Então a possibilidade de alta densidade do hospedeiro associada a alta frequência de acesso livre à rua, da coabitAÇÃO e ao baixo índice de vacinação para FeLV permite a manutenção e a disseminação do vírus na população. Fato que pode ser observado tanto no presente estudo quanto nos anteriormente publicados para a região Sudeste e Sul do país (COELHO et al., 2008; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a).

A utilização em conjunto de dois métodos diagnósticos para FeLV também influenciou no alto número de animais infectados. Quando comparados diferentes métodos como o ELISA e a PCR, que no primeiro caso é voltado para a detecção de antígeno viral e no segundo para a detecção do próvirus, valores de prevalência maiores são obtidos para a PCR. No Brasil, Argentina, Alemanha e Suíça estudos de comparação já foram realizados e enquanto prevalências de 2% e 11,82% no nested-PCR e 3% e 17,5% no real time-PCR foram obtidas, no ELISA as porcentagens são menores, de 1,5%, 7,69%, 1,8% e 12,1%, respectivamente (GOMES-KELLER et al., 2006; ENGLERT et al., 2012; NOVO et al., 2016; LACERDA et al., 2017).

A prevalência obtida para a infecção progressiva ($FeLV^+P$) foi similar a outro estudo realizado na região Sul do país (31%) e superior as obtidas anteriormente para os estados de Santa Catarina (22,3%), Rio de Janeiro (11,52%) e Bahia (1,5%) (ALMEIDA et al., 2012; COSTA et al., 2017; LACERDA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Com relação ao estudo realizado em Santa Catarina, do qual obteve-se 71,4% das amostras do presente estudo, o

aumento da prevalência da infecção progressiva, se deve ao aumento no número de animais doentes na amostra (66,8% para 68,8%) e principalmente aqueles com sinais clínicos relacionados ao FeLV (55,8% para 73,3%) (BIEZUS et al., 2019a). As altas prevalências obtidas para a região Sul do país ocorre, pois, a amostra é originária de uma população hospitalar onde a maioria dos gatos são levados à procura de atendimento clínico por apresentarem doenças, elevando assim a chance de detecção do FeLV (COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a;). Para o estudo realizado no estado do Rio de Janeiro a amostra é heterogênea, obtidas de clínicas veterinárias, abrigos e principalmente domicílios privados (ALMEIDA et al., 2012). Desta maneira, é provável a seleção de muitos animais saudáveis e negativos para o FeLV (MUCHAAMBA et al., 2014; BIEZUS et al., 2019a), assim como no estudo realizado na Bahia (LACERDA et al., 2017).

A proporção de gatos com infecção progressiva foi 3,4 vezes maior que aqueles com infecção regressiva. Esta proporção é maior que as relatadas na Alemanha (1,5) e Suíça (2,2) onde as prevalências obtidas para a infecção regressiva variam de 1,2% a 5,4% (GOMES-KELLER et al., 2006; ENGLERT et al., 2012). Isso acontece, pois, a taxa de infecção nestes locais é menor que a observada na região em estudo, refletindo em menores prevalências para a infecção progressiva e regressiva (GOMES-KELLER et al., 2006; GLEICH et al., 2009; ENGLERT et al., 2012). Outros estudos demonstram que esta proporção pode ser inversa, principalmente quando a maioria dos animais recrutados são saudáveis (WESTMAN et al., 2019).

A coinfecção por FeLV e FIV é descrita com prevalências menores que a observada neste estudo. Na Europa, a prevalência da coinfecção não é superior a 1% e na América do Norte, prevalências de 0,5% e 0,7% foram observadas (LURIA et al., 2004; GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; SPADA et al., 2012). A prevalência para a coinfecção é superior na maioria dos estudos realizados no Brasil, chegando a 4,4% na região Sul do país (COSTA et al., 2017; POFFO et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Os estudos que utilizaram a PCR e o ELISA em conjunto demonstraram resultados variáveis em outras regiões do país, desde a ausência de coinfecção em gatos no estado da Bahia e 2,27% no estado do Mato Grosso (LACERDA et al., 2017; POFFO et al., 2017). No primeiro estudo, novamente, a seleção prioritária de gatos saudáveis exclui uma parte importante da população, uma vez que a infecção por FeLV reduz a expectativa de vida dos felinos devido ao surgimento das diversas alterações clínicas e também que a coinfecção gera maior probabilidade dos felinos apresentarem linfomas (LITTLE et al., 2020). Já no segundo caso, a seleção de animais tanto saudáveis quanto doentes

trouxe uma prevalência mais próxima com a obtida neste estudo, porém, o número de animais testados não é suficiente para inferências a nível populacional (THRUSFIELD, 2007).

A presença de resultados discordantes pode ter ocorrido devido a resultados falso-negativos na PCR, decorrentes de mutação nas sequências referentes aos *primers* escolhidos (WESTMAN et al., 2019). Justificativa que é plausível principalmente no caso do gato que apresentava linfoma multicêntrico, uma enfermidade bastante apresentada em felinos infectados pelo FeLV (STÜTZER et al., 2011). Outra possibilidade é que o ELISA tenha resultado em falso-positivo. Um estudo demonstrou resultados falso-positivos utilizando kits de ELISA voltados para a detecção dos抗ígenos de FeLV em sangue total (HAWKS et al., 1991). No presente estudo, somente amostras de soro foram utilizadas com o objetivo de eliminar variação decorrente do tipo de amostra, porém não é possível excluir a existência da interferência por hemólise. Resultados falso-positivos também podem ser decorrentes de anticorpos antimurinos presentes em 1 a 2% dos gatos, porém o ELISA escolhido para este estudo utiliza reagentes no conjugado líquido para bloquear a ligação dos anticorpos antimurinos aos anticorpos anti-FeLV utilizados no *kit* (LOPEZ et al., 1989; HARTMANN et al., 2001; WESTMAN et al., 2017).

Apesar da idade média dos animais com infecção regressiva por FeLV (FeLV⁺R) ser maior que daqueles com infecção progressiva (FeLV⁺P), a análise estatística não revelou diferença significativa. Resultados similares foram obtidos em estudos conduzido na Alemanha e Austrália (ENGLERT et al., 2012; WESTMAN et al., 2019). A ausência de diferença estatística significativa dos grupos FeLV⁺P e FeLV⁺R em relação ao grupo controle pode ser explicada pelo grande número de animais nas faixas etárias mais jovens neste estudo, refletido pelos baixos valores de mediana e variações interquartil similares. Este achado pode ser reflexo de características populacionais relacionadas a pouca longevidade dos gatos na região, que possui baixa adesão a estratégias de medicina preventiva, como a vacinação, e permite acesso à rua para a maioria dos gatos (BIEZUS et al., 2019a).

Neste estudo, os gatos SRD tiveram maior chance de serem diagnosticados com o desfecho progressivo para a infecção por FeLV (FeLV⁺P) e essa associação não foi observada para o grupo FeLV⁺R. Não existe predisposição racial para a infecção por estes retrovírus e diversos estudos epidemiológicos investigaram este fator e não encontraram correlação com a infecção progressiva ou regressiva (LEVY et al., 2007; GLEICH et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012; ENGLERT et al., 2012; MUCHAAMBA et al., 2014; LUCKMAN; GATES, 2017; WESTMAN et al., 2019). Com resultados similares, outro estudo realizado no Brasil demonstrou maior risco para a infecção progressiva por FeLV em gatos SRD (COSTA et al.,

2017). Uma provável explicação para a infecção por FeLV ser menos observada em raças puras é que elas despendem um valor financeiro e por este motivo comumente são mantidas dentro de casa, além de que os próprios criadores realizam um maior número de exames para controlar a doença (HARTMANN, 2006).

A maior chance de gatos machos apresentarem a infecção progressiva por FeLV foi demonstrada também em outros estudos (LEVY et al., 2007; BLANCO et al., 2009; GLEICH et al., 2009; AKHTARDANESH et al., 2010; COSTA et al., 2017; LUCKMAN; GATES, 2017; BIEZUS et al., 2019a). De maneira geral, gatos machos são expostos a grande variedade de agentes estressores e patógenos devido a sua maior exposição ambiental, pois partem em busca de fêmeas para o acasalamento e desta maneira entram em contato com um número maior de indivíduos da mesma espécie (GOLDKAMP et al., 2008; GLEICH et al., 2009; BIEZUS et al., 2019a).

A presença ou ausência de vacinação para FeLV não teve correlação com os desfechos. Este resultado é reflexo da baixa adesão a testes de triagem para a infecção por FeLV e protocolos de vacinação na população. É importante salientar que os felinos deste estudo nunca haviam sido testados previamente, mesmo os já vacinados. É provável que os felinos vacinados com infecção persistente estivessem infectados antes de receber a vacina, uma vez que esta deve conferir proteção contra este desfecho da infecção (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007; LITTLE et al., 2020).

Nenhum fator associado a infecção progressiva por FeLV foi encontrado associado a infecção regressiva. Este resultado, associado a maior prevalência de animais com infecção progressiva, leva a crer que tamanha diferença tenha ocorrido devido a associação de diversos fatores. A proporção de gatos machos, com acesso livre à rua e a coabitacão entre animais da mesma espécie foram maiores entre os felinos com infecção progressiva, enquanto os gatos com infecção regressiva tiveram proporções similares. Não obstante, exceto para o gênero dos animais FeLV negativos, essas proporções também foram maiores nos demais grupos. Isto demonstra que os felinos neste estudo tinham, na sua maioria, grande exposição ambiental e consequentemente, maior exposição ao vírus, à maiores doses infecciosas e maiores chances de desenvolveram infecção progressiva. Um estudo realizado na Austrália obteve resultados semelhantes em grupos de gatos alojados em instalações de resgate (WESTMAN et al., 2019).

Não houve associação entre o desfecho progressivo da infecção por FeLV e gatos coinfetados por FIV. Estudos que avaliaram antígeno para FeLV e anticorpo para FIV observaram maiores chances de gatos FeLV positivos serem positivos também para FIV (GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009). Este resultado seria esperado devido ao efeito

imunodepressor que ambos os retrovírus desempenham, facilitando infecções concomitantes (HARTMANN, 2011). Neste estudo, os gatos infectados por FIV apresentaram maior risco de serem diagnosticados com o desfecho regressivo da infecção por FeLV. Sabe-se que animais mais velhos tem menor chance de desenvolverem viremia persistente pelo FeLV, ou seja infecção progressiva, em comparação aos felinos mais jovens (HOOVER et al., 1976). Da mesma maneira, que são mais velhos os felinos diagnosticados com FIV (GLEICH et al., 2009; CHHETRI et al., 2015; BIEZUS et al., 2019a). Portanto, é provável que este resultado tenha sido um achado e que o fator idade tenha aumentando a chance de felinos com infecção regressiva por FeLV serem positivos para FIV.

As principais alterações clínicas observadas neste estudo foram linfoma, leucemia, citopenias do tipo arregenerativa e infecções secundárias. Essas enfermidades possuem prognóstico desfavorável e geralmente estão associadas a infecção progressiva por FeLV (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015; SPADA et al., 2018; BIEZUS et al., 2019b). As mesmas doenças puderam ser observadas no grupo FeLV⁺R, porém em menor frequência. Estudos demonstram que felinos com infecção regressiva podem desenvolver doenças fatais como o linfoma e a leucemia (JACKSON et al., 1993; GABOR et al., 2001; SUNTZ et al., 2010), mas estas doenças se manifestam com menos frequência que na infecção progressiva (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011; STÜTZER et al., 2011; WESTMAN et al., 2019).

É possível afirmar que, como consequência do prognóstico desfavorável da infecção progressiva e o desenvolvimento de doenças fatais, os animais do grupo FeLV⁺P estão sujeitos a maior impacto sobre os parâmetros hematológicos (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015; BIEZUS et al., 2019b). Esta afirmação nem sempre foi confirmada por diferença estatística significativa em comparação ao grupo FeLV⁺R porém, está refletida nas menores medianas encontradas para a contagem de eritrócitos, VG, contagem de plaquetas e linfócitos. Não foram encontrados estudos que tenham comparado parâmetros hematológicos entre infecção progressiva e regressiva por FeLV.

As citopenias, principalmente a trombocitopenia e a anemia, foram as principais alterações hematológicas deste estudo e são as mais importantes alterações observadas em associação a infecção progressiva (GLEICH; HARTMANN, 2009; COLLADO et al., 2012; BIEZUS et al., 2019b). A trombocitopenia foi mais relatada que a anemia, porém é descrita na literatura com menor frequência que a anemia e a leucopenia (GLEICH; HARTMANN, 2009; COLLADO et al., 2012). É importante ressaltar que, apesar da alta frequência, somente 25% dos animais do grupo FeLV⁺P apresentaram contagem de plaquetas inferior a $156 \times 10^3/\mu\text{L}$, o

que poderia causar algum prejuízo a capacidade de coagulação. Enquanto para o grupo FeLV⁺R, apesar da diferença estatística significativa observada em relação ao grupo controle, a mediana encontra-se dentro do intervalo de referência ($300\text{-}800 \times 10^3/\mu\text{L}$) (WEISS; WARDROP, 2010).

A anemia, segunda alteração hematológica com maior frequência, pode ter origem neoplásica ou não. No primeiro caso, a anemia acontece em decorrência de leucemias ou síndrome mielodisplásicas (LINENBERGER; SHELTON, 1995). Entre os mecanismos não neoplásicos envolvidos no aparecimento das anemias associadas ao FeLV podem ser citados a infecção primária das células tronco hematopoiéticas e das células do estroma levando ao desenvolvimento de anemia arregenerativa (HARTMANN, 2012). A proporção entre anemia regenerativa e arregenerativa associadas a infecção progressiva por FeLV é de 10 e 90%, respectivamente (STÜTZER et al., 2010), proporção similar à observada neste estudo. Outros estudos também demonstram que a anemia arregenerativa é comumente observada (GLEICH; HARTMANN, 2009; BIEZUS et al., 2019b).

No que se refere aos animais com infecção regressiva, a ocorrência de citopenias entre as principais alterações hematológicas foi um achado incomum, uma vez que são raras associadas a este desfecho (STÜTZER et al., 2010). Existem poucos dados disponíveis que possibilitem a comparação das alterações hematológicas observadas em felinos com infecção regressiva. Nos casos descritos a anemia arregenerativa parece ser consenso, porém nenhum dos casos apresentados relatou citopenias das demais linhagens celulares como observado no presente estudo (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011).

A linfopenia foi a alteração leucocitária mais prevalente neste estudo, e é frequentemente observada em felinos com FeLV (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019b). Apesar de obtida diferença estatística somente para os grupos FeLV⁺P, FeLV⁺R em comparação ao controle, é possível observar que a mediana de FeLV⁺P é menor que a obtida para FeLV⁺R. Esta diferença se deve, provavelmente, ao processo de replicação viral ativo em felinos com infecção progressiva e sintomáticos (GLEICH; HARTMANN, 2009).

Com relação a contagem de eosinófilos, as medianas obtidas nos grupos FeLV⁺P e FeLV⁺R foram significativamente menores que as obtidas no grupo controle, porém este é um achado com pouco significado, uma vez que o valor de referência para a espécie varia de 0 a $1500 \text{ eosinófilos}/\mu\text{L}$ (WEISS; WARDROP, 2010).

As alterações hematológicas descritas também foram frequentes nos grupos FeLV⁺P e FIV⁺ e FeLV⁺R e FIV⁺. Alguns estudos já demonstraram que a coinfeção de FIV com FeLV

progressivo leva ao progresso acentuado da doença quando em comparação aos animais que apresentam somente infecção por FIV (PEDERSEN et al., 1990; HOFMANN-LEHMANN et al., 1997).

As alterações hematológicas observadas no grupo FeLV⁺R e FIV⁺, podem ter sofrido maior influência da infecção por FIV, uma vez que o impacto da infecção regressiva por FeLV sobre o desenvolvimento da doença é menor (STÜTZER et al., 2010; STÜTZER et al., 2011; LITTLE et al., 2020). A anemia pode ser resultado da diminuição de células eritroides progenitoras na medula óssea, relatada em alguns gatos com infecção por FIV (SHELTON et al., 1995). Além disso, o FIV causa o declínio progressivo do sistema imune do hospedeiro, o que reflete em linfopenia (HOSIE et al., 2009). Porém, o felino pode permanecer assintomático durante anos sem vir a apresentar a fase terminal e as alterações clínicas que acompanham (YAMAMOTO, et al., 2007; GLEICH, et al., 2009).

4.7 CONCLUSÃO

A utilização de métodos diagnósticos voltados para a detecção de antígeno viral e próvírus, permitiu determinar que a população de gatos Planalto Catarinense apresenta elevada prevalência para a infecção por FeLV. A prevalência encontrada para a infecção progressiva, associada aos hábitos de vida dos felinos, demonstram que a população estudada apresenta alto risco de contrair este vírus.

Por meio da análise das variáveis epidemiológicas foi possível evidenciar a ausência de similaridades entre os fatores associados as infecções progressiva e regressiva por FeLV. A avaliação hematológica demonstrou que ambos os desfechos da infecção apresentam impacto sobre a saúde dos felinos, porém, as alterações relacionadas a infecção progressiva são mais frequentes e graves.

5 ARTIGO 2

5.1 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E ALTERAÇÕES CLÍNICAS EM GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA OU REGRESSIVA PELO *Feline leukemia virus* (FeLV).

5.2 RESUMO

A infecção pelo *Feline leukemia virus* (FeLV) apresenta três principais desfechos: progressivo, regressivo e abortivo. Poucos estudos realizaram o acompanhamento clínico prolongado dos gatos com os diferentes desfechos da infecção. O objetivo deste estudo é caracterizar as apresentações clínicas e o efeito dos desfechos progressivos e regressivos da infecção por FeLV na expectativa de vida dos gatos. Foram selecionados 176 gatos, 116 com infecção progressiva (FeLV⁺P) e 30 com regressiva (FeLV⁺R) e 30 gatos FIV e FeLV negativos (Controle), testados pelo método de ELISA, para antígeno p27 do FeLV e por nested-PCR para DNA proviral correspondente a região U3-LTR e gene *gag*. Os felinos foram acompanhados clinicamente até o óbito ou pelo período de 12 a 54 meses. A análise de sobrevivência foi realizada por meio da análise de Kaplan-Meier e regressão de COX. O tempo mediano de sobrevivência após o diagnóstico de FeLV foi 30 dias para o grupo FeLV⁺P e não foi alcançado nos demais grupos. As variáveis, estado de saúde no momento da inclusão do felino no estudo e desfecho progressivo da infecção por FeLV aumentaram em 4 e 5 vezes o *Hazard Ratio* (HR) para o desfecho óbito na população em geral. Dentro dos grupos, animais doentes apresentaram HR para o desfecho óbito 3 e 13 vezes maior nos grupos FeLV⁺P e FeLV⁺R, respectivamente. Em 74 gatos do grupo FeLV⁺P foi possível determinar a doença responsável pelo óbito, as principais foram: linfoma (28), leucemia (18), alterações hematológicas de causa indeterminada – AHCI (12), PIF (5) e infecções bacterianas (5). Para 5 gatos do grupo FeLV⁺R as causas das mortes foram: leucemia (2), AHCI (1), PIF (1), carcinoma de células escamosas (1). As alterações hematológicas mais observadas nos casos de leucemia (20) foram: anemia (19), trombocitopenia (16) e linfocitose (14). Nos casos de AHCI (15) foram: anemia (15), trombocitopenia (10) e neutropenia (6). A infecção progressiva por FeLV reduz a expectativa de vida levando ao desenvolvimento frequente de linfoma, leucemia e anemia. Isto é menos frequente no desfecho regressivo que não apresenta efeito direto sobre a curva de sobrevivência.

Palavras-chaves: medicina felina, retrovírus, doença viral.

5.3 INTRODUÇÃO

Feline leukemia virus (FeLV) é considerado um dos vírus mais prejudiciais à saúde dos gatos e está presente em diversas populações por todo o mundo (GLEICH et al., 2009; HARTMANN, 2012; MUCHAAMBA et al., 2014; NOVO et al., 2016; BIEZUS et al., 2019a). Alguns países conseguiram conter o avanço desse vírus enquanto que no Brasil, as prevalências obtidas permanecem elevadas tornado a população de felinos ideal para a investigação dos aspectos clínicos da doença (GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; ENGLERT et al., 2012; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a).

A infecção por FeLV pode apresentar diferentes desfechos no hospedeiro, considerando três como os principais: infecção progressiva, regressiva e abortiva (LITTLE et al., 2020). Todos estes desfechos podem ser observados em infecções naturais por FeLV e são influenciados pela capacidade imunológica do hospedeiro em controlar a viremia (HOOVER e MULLINS, 1991; HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; HATMANN, 2012; WESTMAN et al., 2019).

O primeiro desfecho (progressivo) ocorre devido à ineficácia da resposta imune do hospedeiro frente a infecção viral, com inserção do provírus no genoma do felino e desenvolvimento da viremia persistente. No segundo desfecho (regressivo), a resposta imune é parcialmente efetiva, combatendo o FeLV no início da sua disseminação na medula óssea impedindo a viremia persistente, mas não a integração do DNA proviral. No terceiro desfecho (abortivo) o vírus é combatido antes de chegar na medula óssea. Este animal é considerado apenas exposto ao vírus e terá como único indicativo a produção de anticorpos contra FeLV (HARTMANN, 2012; LITTLE et al., 2020).

Somente a infecção progressiva e regressiva apresentam gravidade clínica comprovada (HARTMANN, 2012; NESINA et al., 2015). Animais com infecção progressiva apresentam baixa expectativa de vida, sobrevivendo somente 3 a 4 anos após o contato com o vírus, devido ao desenvolvimento de alterações clínicas como o linfoma e a leucemia, desordens hematológicas de origem não neoplásica e imunodeficiência facilitando o desenvolvimento de infecções concomitantes (HOOVER et al., 1975; OGILVIE et al., 1988; REINACHER, 1989; SHEETS et al., 1993; LUTZ et al., 2009; BIEZUS et al., 2019b; CRISTO et al. 2019a, b). Entre as principais infecções concomitantes que afetam estes gatos, pode ser citado o vírus da imunodeficiência felina (FIV), sendo este também o principal diagnóstico diferencial (LITTLE et al., 2020).

Para a infecção regressiva a principal implicação à saúde do felino é a capacidade de reativação do provírus a partir de episódios de imunodeficiência, causando então a infecção persistente. Outra implicação seria a capacidade de interação do DNA proviral com proto-oncogenes celulares, que pode ocorrer mesmo em infecções regressivas mediante o processo de mutagênese insercional adquirida somaticamente e resulta em neoplasias, mesmo nos felinos mais velhos (ROJKO et al., 1982; HARTMANN, 2012). Além disso, gatos com infecção regressiva podem transmitir o FeLV por meio de transfusões sanguíneas e o felino receptor pode vir a apresentar viremia (NESINA et al., 2015). Acredita-se que até 10% dos gatos apresente esse tipo de infecção (MÖSTL et al., 2015).

Na literatura nacional e internacional faltam estudos que levem em consideração o acompanhamento clínico prolongado dos gatos que apresentam a infecção por FeLV e em especial, que levem em conta os dois principais desfechos da infecção. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar as apresentações clínicas e o efeito dos desfechos progressivos e regressivos da infecção por FeLV na expectativa de vida dos gatos.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Seleção da amostra

Foram selecionados gatos provenientes da rotina de atendimentos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do CAV-UDESC, no período de novembro de 2015 a agosto de 2019. Estes gatos fizeram parte de um estudo epidemiológico, sobre o desfecho progressivo e regressivo da infecção por FeLV no Planalto de Santa Catarina. Ao todo foram testados, 384 gatos para a presença de anticorpo contra o FIV e antígeno do FeLV por meio do método de ELISA, utilizando o kit SNAP FIV/FeLV Combo Test® (IDEXX Laboratories). Foi realizado também o nested-PCR, para a detecção de DNA proviral, conforme a técnica descrita por Miyazawa e Jarret (1997), para amplificar a região U3-LTR e gene gag.

Por meio de contato telefônico ou presencial os tutores dos felinos foram convidados a participar do projeto. Para tanto, assinaram um "Termo de consentimento livre e esclarecido" (Apêndice A).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 5806100918).

5.4.2 Determinação do desfecho da infecção para FeLV

Foram considerados com infecção progressiva, os gatos positivos para FeLV por meio de ELISA e nested-PCR. Foram considerados com infecção regressiva os gatos positivos para FeLV por meio de nested-PCR e negativos no ELISA.

Baseado nesses critérios foram formados três grupos: 116 gatos infectados pelo FeLV com infecção progressiva (FeLV⁺ P); 30 gatos infectados pelo FeLV com infecção regressiva (FeLV⁺ R); 30 gatos negativos para FeLV (controle). Não foram realizadas segregações quanto a raça, idade, sexo, estado de saúde e diagnóstico de FIV. Para os felinos dos grupos FeLV⁺ P e FeLV⁺ R vivos ao final do estudo, foi oferecido um novo teste de ELISA e nested-PCR, com a finalidade de detecção de mudança no desfecho da infecção.

5.4.3 Acompanhamento clínico

Os felinos dos três grupos foram acompanhados clinicamente, de forma presencial ou contato telefônico semestral, do momento da inclusão do felino no estudo até o óbito ou término do estudo. Como critério de inclusão, foi estipulado que o felino pudesse ser acompanhado por no mínimo 12 meses antes da data prevista para o término do estudo, que aconteceu em 01 de outubro de 2020.

O acompanhamento presencial acontecia conforme a necessidade individual de cada paciente e a disponibilidade do tutor em levar o animal ao HCV. Os animais eram submetidos ao exame físico, hemograma e exames complementares de imagem e laboratoriais no caso de necessidade. No exame físico eram realizadas a 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 cálculos dentários, gengivite e estomatite), auscultação cardiopulmonar, temperatura retal, exame ortopédico e neurológico completo.

No caso de óbito durante o período do acompanhamento, mediante autorização dos tutores, os felinos eram encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA, CAV/UDESC) para a realização da necropsia e exame histopatológico.

5.4.4 Análise de sobrevivência

Para a análise de sobrevivência foi utilizada inicialmente a abordagem não paramétrica, por meio da análise de Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958). O intervalo de observação estipulado para a análise de sobrevivência foi de 2 anos (730 dias). A variável tempo foi definida como número de dias entre o momento zero (eixo x) e a ocorrência do evento. O evento foi considerado como variável binária (0, 1), onde 1 corresponde ao óbito e 0 corresponde aos dados censurados (abandono do estudo, perda de informação, não ocorrência do óbito após 2 anos de acompanhamento). As curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando os testes de Log Rank, Gehan-Breslow-Wilcoxon e Tarone-Ware e $p<0,05$ foi considerado diferença estatística significativa.

Diante da proporcionalidade dos riscos o modelo de regressão de COX foi aplicado (COX, 1972; COX; OAKES, 1984). As variáveis utilizadas para a análise foram: idade no momento da inclusão do felino no estudo; estado de saúde dos felinos no momento da inclusão no estudo; desfecho da infecção para FeLV (grupos FeLV⁺P, FeLV⁺R e controle); coinfecção por FIV. Valores de $p<0,05$ foi considerado com diferença estatística significativa. Ambas as análises foram realizadas no software estatístico IBM® SPSS® Statistics, versão 25.

5.4.5 Análise dos dados clínicos

Os felinos dos grupos FeLV⁺ P e FeLV⁺ R tiveram seus prontuários avaliados. Os dados obtidos durante as consultas e exames complementares, desde o momento da inclusão no estudo ao momento do óbito ou término deste estudo, foram coletados e distribuídos em tabelas de contingência no software Excel.

Dados como a idade, raça, sexo e a condição corporal dos felinos também foram obtidos. Quanto a condição corporal os gatos foram classificados em escores de acordo com as diretrizes estabelecidas pela avaliação da *Global nutrition committee of the world small animal veterinary association* (LAFLAMME, 1997). Foram classificados da seguinte maneira, de acordo com o índice de condição corporal (ICC): Animais caquéticos tinham o índice de condição corporal (ICC) entre 1 e 2; os classificados como magros tinham o ICC igual a 3; os com condição corporal regular tinham o ICC de 4 a 5; aqueles com sobrepeso tinham o ICC de 6 a 9.

O estado de saúde observado no momento da inclusão no estudo e no momento do óbito foram comparadas e cruzadas com resultados de exame anatomapatológico, quando presentes.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 A amostra

Do total de animais que participaram do estudo (176), 92% foram classificados como sem raça definida (SRD) e 8% como raças puras. Quanto ao gênero, 58% eram machos e 42% fêmeas. Os dados obtidos para a análise de sobrevivência podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8 — Distribuição dos gatos de cada grupo (FeLV⁺P, FeLV⁺R e controle) de acordo com as variáveis estudadas na análise de sobrevivência.

Variáveis		FeLV ⁺ P; n=116	FeLV ⁺ R; n=30	Controle; n=30
Idade à inclusão do estudo	mediana (25-75%) em meses	33 (18-60)	23 (12-60)	48 (24-99)
Coinfecção pelo FIV	Sim (%)	8 (6,9)	4 (13,3)	0
	Não (%)	108 (93,1)	26 (86,7)	30 (100)
Estado de saúde à inclusão do estudo	Doente (%)	100 (86,2)	11 (36,7)	17 (56,7)
	Saudável (%)	16 (13,8)	19 (63,3)	13 (43,3)
Estado de vida à conclusão do estudo	Óbito (%)	103 (88,8)	9 (30,0)	9 (30,0)
	Vivo (%)	10 (8,6)	14 (46,7)	15 (50,0)
	Indefinido (%)	3 (2,6)	7 (23,3)	6 (20,0)
Eutanásia <i>in extremis</i>	Sim (%)	24 (23,3)	1 (11,1)	2 (22,2)
	Não (%)	79 (76,7)	8 (88,9)	7 (77,8)
Óbito por causas associadas ou com possível associação ao FeLV	Sim (%)	70 (68,0)	4 (44,5)	1 (11,0)
	Não (%)	4 (3,9)	1 (11,0)	4 (44,5)
	Diagnóstico Indefinido (%)	29 (28,1)	4 (44,5)	4 (44,5)

FeLV⁺P: infectados progressivamente pelo FeLV; FeLV⁺R: com infecção regressiva pelo FeLV; IC: Intervalo de confiança. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Dos animais no grupo FeLV⁺P que tiveram o estado de vida indefinido ao final do estudo [2,59% (3/116)], dois fugiram de casa após 1 e 16 meses de acompanhamento, respectivamente e um foi perdido o contato com o tutor após 24 meses. No grupo FeLV⁺R [23,33% (7/30)], cinco gatos haviam fugido de casa em um intervalo de 1 a 40 meses de acompanhamento e para os outros dois foi perdido contato com o tutor após 25 e 27 meses de acompanhamento. No grupo controle [20,0% (6/30)] o motivo foi a perda de contato com os proprietários, após 5 a 26 meses de acompanhamento.

5.5.2 Análise de sobrevivência

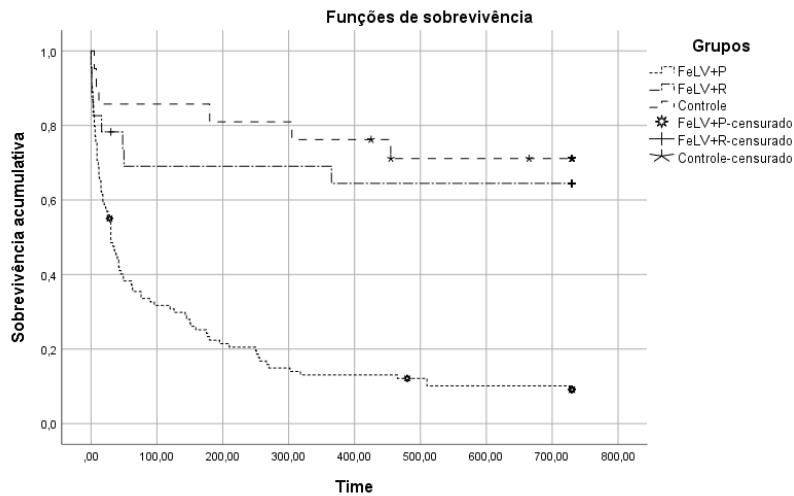
Do total de animais que vieram a óbito no estudo, o mesmo ocorreu após 730 dias para 3,9% (4/103) e 30,0% (3/9) dos gatos dos grupos FeLV⁺P e controle, respectivamente. Estes

animais foram considerados vivos na análise de sobrevivência. Do total de gatos que estavam vivos ao término do estudo, tinham menos de 730 dias de acompanhamento 60,0% (6/10) dos felinos no grupo FeLV⁺P. Para os grupos FeLV⁺R e controle essa porcentagem foi de 50,0% (7/14) e 60,0% (9/14), respectivamente, estes animais foram excluídos na análise de sobrevivência.

Todos os gatos do grupo FeLV⁺P coinfectados com FIV e somente um no grupo FeLV⁺R vieram à óbito antes de 730 dias de acompanhamento.

O tempo mediano de sobrevivência após o diagnóstico foi 30 dias (20,80 - 39,16 dias) para o grupo FeLV⁺P e não foi alcançado nos grupos FeLV⁺R e controle. O *status* FeLV progressivo apresentou efeito significante na longevidade dos gatos, com $p<0,001$ para os testes de Log Rank, Gehan-Breslow-Wilcoxon e Tarone-Ware. A comparação entre as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os três grupos pode ser observada no Gráfico 1.

Gráfico 1 — Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier obtidas para os gatos com infecção progressiva por FeLV (FeLV⁺P; n=110), com infecção regressiva (FeLV⁺R; n=23) e grupo controle (n=21). O tempo mediano de sobrevivência para os grupos FeLV⁺R e controle não foram alcançados e para o grupo FeLV⁺P foi de 30 dias. A diferença entre as curvas foi estatisticamente significante ($p<0,001$).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A regressão de COX demonstrou que: as variáveis, estado de saúde no momento da inclusão do felino no estudo e desfecho da infecção por FeLV (grupos) apresentaram aumento significativo na razão de risco (HR) médio no desfecho (óbito) dos felinos ao longo do tempo ($p<0,001$). Felinos que já estavam doentes no momento da inclusão no estudo e que pertenciam

ao grupo FeLV⁺P, foram 4 vezes e 5,5 vezes mais prováveis de virem a óbito, respectivamente. Os valores de HR e *p* estimados pela regressão de Cox podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 — Razão de risco e valores de *p* estimados, pela análise de regressão de Cox, para as variáveis associadas as curvas de sobrevivência dos gatos.

Variáveis da equação	Regressão de COX		
	n	Valor de <i>p</i>	HR (IC:95%)
Idade		0,59	1,00 (0,99-1,01)
Doente	Sim	124	<0,001
	Não	30	-
Coinfecção com FIV	Sim	12	0,90
	Não	142	-
Grupos	FeLV ⁺ P	110	<0,001
	FeLV ⁺ R	23	0,16
	Controle	21	-

HR: Hazard Ratio ou razão de risco; IC: intervalo de confiança. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As mesmas variáveis foram submetidas à regressão de COX para cada grupo do estudo. A variável estado de saúde apresentou aumento significativo na razão de risco (HR) médio, para o desfecho (óbito), ao longo do tempo nos grupos FeLV⁺P (*p*=0,05) e FeLV⁺R (*p*=0,02). Felinos do grupo FeLV⁺P e FeLV⁺R, que já estavam doentes no momento da inclusão no estudo, foram 3 e 13 vezes mais prováveis de virem a óbito, respectivamente. Os valores de HR e *p* estimados pela regressão de Cox podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 — Razão de risco e valores de *p* estimados, pela análise de regressão de Cox, para as covariáveis associadas as curvas de sobrevivência dos gatos de acordo com os grupos FeLV⁺P (n=110), FeLV⁺R (n=23) e grupo controle (n=21).

Variáveis da equação	Regressão de COX					
	FeLV ⁺ P		FeLV ⁺ R		Controle	
	P	HR (IC:95%)	<i>p</i>	HR (IC:95%)	<i>p</i>	HR (IC:95%)
Idade	0,50	1,0 (0,99-1,01)	0,36	1,0 (0,99-1,02)	0,39	1,01 (0,99-1,03)
Doente	Sim	0,05	3,09 (1,41-6,75)	0,02	13,33 (1,43-124,03)	0,39
	Não	-	-	-	-	-
FIV+	Sim	0,55	1,25 (0,6-2,60)	0,29	0,32 (0,04-2,68)	-
	Não	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

5.5.3 Acompanhamento clínico

Dos animais que faleceram no grupo FeLV⁺P e que foi possível determinar a causa do óbito (74), em 89,2% dos casos a doença no momento da inclusão do felino no estudo foi considerada a responsável pelo óbito e para 10,8% diferiram. Para o grupo FeLV⁺R (5) e controle (5), em todos os casos a alteração clínica observada no momento da inclusão no estudo foi a responsável do óbito.

Dos gatos que permaneceram vivos ao final do estudo, 50,0% (5/10) no grupo FeLV⁺P, 28,6% (4/14) no grupo FeLV⁺R e 33,3% (5/15) no grupo controle apresentaram manifestações clínicas no momento da inclusão no estudo. Os dados obtidos quanto as manifestações clínicas observadas podem ser visualizadas Tabela 11.

Tabela 11 — Frequência das manifestações clínicas e óbitos, em gatos com infecção progressiva (FeLV⁺P), regressiva (FeLV⁺R) e negativos para FeLV (Controle), observadas no período de novembro de 2015 a agosto de 2019.

Alterações clínicas	FeLV ⁺ P (n=84)		FeLV ⁺ R (n=19)		Controle (n=20)	
	Frequência	Óbitos n=74	Frequência	Óbitos n=5	Frequência	Óbitos n=5
AHCI	2*+11**	1*+11**	1*+1**	1**	-	-
Anemia aplásica	1*	1*	-	-	-	-
Asma	-	-	-	-	-	1**
Ausência de alterações	4*+5**	-	4*+10**	-	2*+10**	-
CGEF	3*+1***+9***	9***	1**	-	1**	-
Dermatite	1*	-	-	-	-	-
DRC	1* ***	-	-	-	-	-
DTUIF	1*	-	-	-	2**	1**
Fecaloma	1*	1*	-	-	-	-
Gastroenterite	2*	-	-	-	-	-
Hepatopatia	1*	-	-	-	1*+1**	1**
Infecção bacteriana	1*+5***+1***, ***	5***+1 ***	1*+1***, ***	1***	1*	-
Infecção fúngica	-	-	-	-	1**	1**
Infecção parasitas	1*, ***	1***	-	-	-	-
Linfoma	3*+26**	3*+25**	1**	-	-	-
Leucemia	3*+15**	3*+15**	2**	2**	-	-
Outras neoplasias	3***+1*, ***	3***+1***	1**	1**	1**	1**
PIF	5**	5**	1**	1**	1**	1**
Trauma	1**	1**	-	-	-	-
Úlcera de córnea	1*	-	-	-	-	-
Total	28*+70***+13***	9*+65***+12***	6*+18***+1***	5***+1***	4*+18**	5**

AHCI: alteração hematológica de causa indeterminada; CGEF: complexo gengivite estomatite felino; DTUIF: doença do trato urinário inferior dos felinos; FIV: vírus da imunodeficiência felina; DRC: doença renal crônica; PIF: peritonite infecciosa felina; * alterações clínicas apresentadas somente em um dos períodos da análise; ** alterações clínicas que permaneceram do início ao final do estudo; *** alterações clínicas concomitantes. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para as doenças identificadas somente no grupo FeLV⁺P, a aplasia de medula ocorreu em um macho, SRD, com 79 meses de idade, que estava saudável no momento do diagnóstico e após 7 meses desenvolveu um quadro de apatia, anorexia e palidez de mucosas que resultou na sua morte. No hemograma apresentou anemia arregenerativa (VG: 10%; reticulócitos: 13770/ μ L), trombocitopenia (plaquetas: 61x10³/ μ L) e neutropenia (neutrófilos segmentados: 238/ μ L). O diagnóstico definitivo foi obtido por meio de exame anatomo-patológico, que revelou substituição de mais de 90% do tecido hematopoietico e das células reticulares da medula óssea por adipócitos.

O caso relatado como infecção parasitária se refere a uma pneumonia por *Aelurostrongylus* sp., que ocorreu em associação a PIF. Ambos os diagnósticos foram obtidos por meio de exame anatomo-patológico de uma gata SRD, com 2 anos de idade, que estava caquética e foi atendida já em estado comatoso.

Os gatos com gastroenterite apresentaram a alteração no momento da inclusão no estudo. Ambos estavam vivos ao final do estudo, mas enquanto um se recuperou e permaneceu saudável aos 48 meses de acompanhamento o outro desenvolveu complexo gengivite estomatite felina (CGEF) após 16 meses. Os demais animais do grupo FeLV⁺P que apresentaram doenças não correlacionadas com o FeLV, exceto para o caso em que o óbito ocorreu por politraumatismo, desenvolveram doenças neoplásicas em um intervalo de 4 a 22 meses. Os felinos com hepatopatia, dermatite e DTUIF desenvolveram leucemias e o felino com úlcera de córnea desenvolveu linfoma.

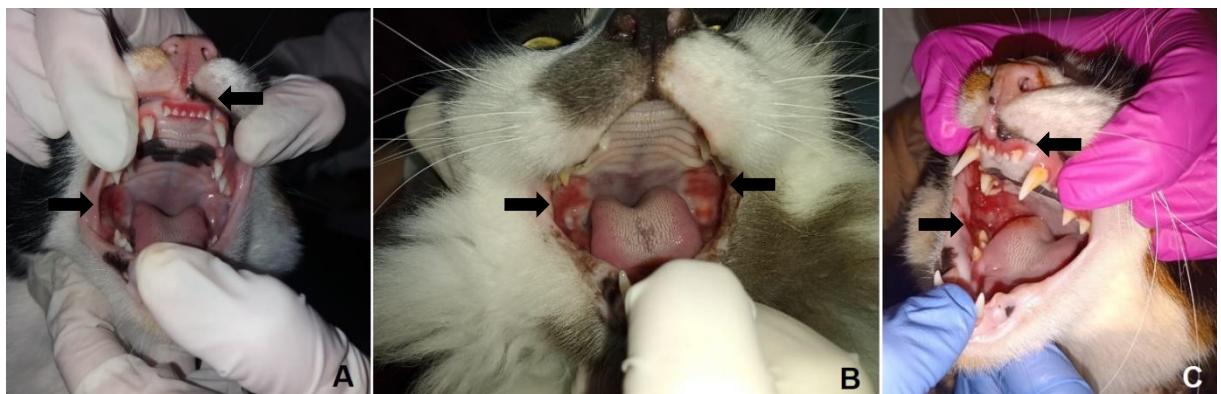
Para as doenças diagnosticadas em mais de um grupo, o CGEF esteve entre as mais relatadas. Todos os casos no grupo FeLV⁺P (13) foram relatados em gatos SRD, dos quais 69,2% eram machos, 30,8% fêmeas e tinham ao óbito a mediana de 21 meses de idade (variação: 15 a 42,8 meses). Os sinais clínicos observados foram halitose (46,2%), disfagia (33,3%), sialorreia (53,8%) e aumento de linfonodo mandibular (38,5%). A maioria dos gatos estavam magros (46,2%) ou com condição corporal regular (30,8%) e os demais (23,1%) estavam caquéticos.

Para os casos no grupo FeLV⁺P, em que o CGEF foi considerado doença concomitante (9), as causas de óbito foram: leucemia (44,5%), linfoma (22,2%), AHCI (11,1%), PIF (11,1%) (1/9) e histiocitoma fibroso maligno [11,1% (1/9)]. Dos casos de CGEF diagnosticados como doença única (4/13), em dois gatos a mesma foi diagnosticada no momento da inclusão do felino no estudo. Um dos gatos apresentou recuperação das lesões na cavidade oral, mas após 12 meses foi diagnosticado com linfoma de mediastino e faleceu com 17 meses de acompanhamento, devido um quadro de constipação com consequente formação de fecaloma.

O outro animal permaneceu com CGEF do início ao final do estudo, não veio a óbito, mas desenvolveu doença renal crônica (DRC) após 51 meses de acompanhamento. Nos dois casos restantes, a doença foi diagnosticada na última avaliação dos felinos. Estes gatos, apresentavam no momento da inclusão no estudo gastroenterite e AHCI, se recuperaram, e 19 meses e 22 meses depois foram diagnosticados com CGEF.

O animal com CGEF no grupo FeLV⁺R era um gato SRD, macho, com 96 meses que apresentava halitose e disfagia. O felino foi diagnosticado com CGEF no momento da inclusão do estudo e permaneceu com a alteração mesmo após 14 meses de acompanhamento clínico. Três pacientes com CGEF podem ser observados na Figura 1.

Figura 1 — Três felinos com infecção progressiva por FeLV, apresentando complexo gengivite estomatite felino (CGEF) com graus de lesão: (A) leve, onde observa-se (nas setas) gengiva eritematosa ao redor dos incisivos, erosão com superfície avermelhada focal e unilateral na gengiva e palato mole; (B) moderado, no qual as erosões tendem a ser focalmente extensas e bilaterais na gengiva, partindo dos molares até o palato mole (setas); e (C) acentuada, onde nota-se (nas setas) gengiva eritematosa ao redor dos incisivos e aprofundamento das erosões gengivais, destruição da mucosa e hemorragia leve a moderada, inclusive margeando molares e pré-molares.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As infecções bacterianas diagnosticadas no grupo FeLV⁺P ocorreram somente em gatos SRD, dos quais 71,4% (5/7) eram machos e 28,6% (2/7) fêmeas. A idade mediana ao óbito foi de 36 meses (variação: 35 a 60 meses). Todos os gatos apresentavam a alteração clínica no momento da inclusão no estudo.

Em 57,1% (4/7) dos casos a infecção afetou o trato respiratório inferior. Estes gatos foram atendidos com anorexia, dispneia e mucosas pálidas, 75,0% (3/4) apresentavam

desidratação, 50,0% (2/4) estavam magros e 25,0% (1/4) hipotérmicos. O exame anatomo-patológico revelou um caso de broncopneumonia necrosupurativa multifocal, em que a análise microbiológica demonstrou crescimento de *Streptococcus* sp., *Staphylococcus schleiferi coagulans* e *Corynebacterium* sp., um caso de broncopneumonia e pleuropneumonia necrosupurativa difusa por *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella ozaenae* (Figura 2A), um caso de pleuropneumonia difusa e outro de broncopneumonia granulomatosa multifocal em que não foram realizadas cultura bacteriana. O caso de broncopneumonia granulomatosa foi considerado doença concomitante e estava associado a leucemia linfóide aguda.

Os demais casos [42,9% (3/7)] de infecções bacterianas diagnosticadas no grupo FeLV⁺P foram: em um felino que apresentava desidratação, edema facial e aumento de linfonodos mandibulares em decorrência de um abscesso em cavidade nasal; em um felino que apresentou mucosas pálidas, edema de membro torácico esquerdo e claudicação devido a um flegmão. Em ambos os casos o agente infeccioso não foi identificado e a infecção culminou com a morte dos pacientes. Somente um gato, que tinha 60 meses de idade, diagnosticado com artrite séptica em articulação tibiotársica causada por *Staphylococcus schleiferi*, apresentou recuperação clínica do quadro infeccioso. Aos 56 meses de acompanhamento o felino permanecia saudável.

As infecções bacterianas relatadas no grupo FeLV⁺R foram: em um macho, SRD, com 84 meses de idade que apresentava hiporexia, apatia, taquipneia e palidez de mucosas e foi diagnosticado com micoplasmoses por meio de esfregaço sanguíneo no momento da inclusão no estudo; uma fêmea Siamês, de 8 meses que apresentou prostração, anorexia e abscesso em região axilar esquerda, à inclusão no estudo, em que o agente etiológico não foi determinado. O caso de micoplasmoses estava associado a leucemia mieloide.

Os linfomas no grupo FeLV⁺P (n=29) foram do tipo mediastinal (62,1%) (Figura 2B), multicêntrico (20,7%), extranodal (13,8%) e alimentar (3,5%). Foram diagnosticados em somente um gato da raça Siamês e os demais (96,5%) eram SRD. Ocorreram comumente em fêmeas (58,6%) e em menor número (41,4%) em machos. Somente 6,9% dos animais com linfoma eram saudáveis no momento da inclusão do estudo e desenvolveram a doença 5 e 9 meses após a primeira consulta. Para 33,3% (2/6) dos casos de linfoma multicêntrico foi observada a coinfecção por FIV.

Figura 2 — Cavidade torácica de dois gatos com infecção progressiva por FeLV, apresentando: (A) piotórax, deposição de fibrina e pus na superfície pleural devido a broncopneumonia e pleuropneumonia necrosupurativa difusa por *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella ozaenae*; (B) Massa extensa em região de mediastino, recobrindo dois terços da cavidade torácica devido a linfoma de mediastino.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No grupo FeLV⁺R, uma gata Siamês, com 13 meses de idade, foi diagnosticada com linfoma mediastinal e estava em acompanhamento há 21 meses quando o estudo terminou. No momento do óbito, os gatos com linfoma tinham a idade mediana de 36 meses (variação: 17,5 a 63,25 meses). Os sinais clínicos observados nos gatos com linfoma podem ser visualizados na Tabela 12.

Os linfomas extranodais (4) foram representados por um em cavidade nasal, causando aumento de volume em face e abrangendo a órbita ocular direita, outro em medula espinhal entre L2 e L3 e dois linfomas subcutâneos. Os dois últimos foram caracterizados por tumores subcutâneos não ulcerados aderidos a pele. Em um dos casos, diagnosticado após 22 meses de acompanhamento, a região acometida foi a axilar direita, com uma massa de aproximadamente 7x10cm não aderida aos tecidos adjacentes e o envolvimento do linfonodo axilar foi descartado

via ultrassonografia. No segundo caso a região acometida foi a região dorsal às vertebras sacrais, com formação de um nódulo de aproximadamente 3x5cm que na palpação estava aderido a musculatura adjacente. O nódulo foi visualizado mediante estudo radiográfico da região sacral. Ambos os diagnósticos foram obtidos por citologia aspirativa por agulha fina (CAAF).

A comprovação do diagnóstico de linfoma se deu em 10% (3/30) dos casos por análise de efusão pleural, 26,7% (8/30) por CAAF e em 20% (6/30) por exame anatopatológico. Para o restante dos animais [43,3% (13/30)], o diagnóstico foi obtido pelo uso em conjunto de dois ou mais métodos. A análise de efusão pleural e exame anatopatológico foram utilizados em conjunto para 46,1% (6/13), a CAAF e o exame anatopatológico para 30,8% (4/13), a análise de efusão pleural e a CAAF para 7,7% (1/13) e os três métodos para 15,4% (2/13) dos casos.

Dos casos leucemia, no grupo FeLV⁺P 89,0% (16/18) foram diagnosticados em gatos SRD e 5,5% (1/18) em Siamês e 5,5% (1/18) em Persa. Eram machos 55,6% dos gatos e fêmeas 44,4%. A idade mediana destes animais ao óbito foi de 48 meses (variação: 24 a 63 meses). Os sinais clínicos apresentados por estes felinos podem ser observados na Tabela 12.

Para 55,6% (10/18) dos casos de leucemia no grupo FeLV⁺P foi realizada análise anatopatológica, permitindo classificar como leucemia mieloide aguda [40,0% (4/10)], leucemia mieloide crônica [30,0% (3/10)] e leucemia linfoide aguda [30,0% (3/10)]. Estes felinos apresentaram infiltração neoplásica em outros órgãos, principalmente fígado (80,0%) e baço (50,0%), além de pulmões, encéfalo e linfonodos (30,0%), intestinos e rins (20,0%), coração e estômago (10,0%). Para os demais casos [44,4% (8/18)], o diagnóstico ocorreu por meio da avaliação hematológica e a exclusão de qualquer evidência de linfoma ao exame físico.

Os animais com leucemia (2) no grupo FeLV⁺R eram SRD e machos. Ao óbito tinham 84 meses e 192 meses de idade. Foram submetidos a avaliação anatopatológica com diagnóstico de leucemia mieloide crônica e linfoide aguda. Ambas as leucemias causaram infiltração neoplásica em fígado [100,0% (2/2)] e somente a mieloide crônica [50,0% (1/2)] em coração, baço, pulmões, encéfalo e rins. As alterações hematológicas nos gatos com leucemia podem ser visualizadas na Tabela 13.

Os gatos que apresentaram alterações hematológicas, mas que a fisiopatologia não foi determinada, foram classificados com alteração hematológica de causa indeterminada (AHC). No grupo FeLV⁺P todos eram SRD, 76,9% (10/13) machos e 23,1% (3/13) fêmeas. A idade mediana ao óbito foi de 18 meses (variação: 12,5 a 51,5 meses). Somente um felino estava saudável no momento do diagnóstico de FeLV, mas tinha coinfecção pelo FIV e desenvolveu

o quadro de AHCI após 9 meses de acompanhamento clínico. Ainda um felino apresentou recuperação do quadro e foi diagnosticado com CGEF com 22 meses de acompanhamento.

No grupo FeLV⁺R os felinos acometidos eram uma fêmea SRD e um macho Siamês, ambos foram diagnosticados com a alteração no momento da inclusão no estudo. A primeira veio a óbito devido a alteração com 22 meses de vida e o segundo foi diagnosticado aos 36 meses, recuperou-se, aos 28 meses de acompanhamento contraiu FIV, mas permaneceu saudável até o final do estudo. Todos os gatos apresentaram palidez de mucosa em decorrência da anemia (Figura 3A) e somente 15,4% apresentaram petequias em decorrência da trombocitopenia (Figura 3B), os demais sinais clínicos podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 12 — Índice de condição corporal e sinais clínicos observadas no exame físico dos gatos com infecção progressiva e regressiva por FeLV que desenvolveram alteração hematológica de causa indeterminada (AHCI), linfoma ou leucemia.

Sistema acometido	Sinais clínicos	AHCI n=15	Linfoma n=30	Leucemia n=20
Índice de condição corporal	Caquético	5	10	5
	Magro	6	7	5
	Regular	4	10	9
	Sobrepeso	0	3	1
Alteração comportamental	Apatia	8	18	16
	Isolamento	1	2	4
Cardiovascular	Desidratação	10	15	15
	Sopro	1	0	1
Gastrointestinal	Anorexia/ hiporexia	12	25	17
	Constipação	-	2	-
	Diarreia	3	2	2
	Disfagia	-	1	-
	Emese	2	3	4
	Regurgitação	-	9	-
	Sialorreia	-	1	1
Geniturinário	Atonia de bexiga	-	3	-
Linfoadenomegalia	Mandibular	1	3	2
	Poplíteo	-	3	5
	Pré-escapular	-	1	-
	Claudicação	-	-	1
Musculoesquelético	Anisocoria	-	3	-
	Convulsão	-	-	1
	Estupor	-	1	1
	Paresia de membros pélvicos	-	4	1
Pele e mucosas	Mucosas cianóticas	1	1	-
	Mucosas hiperêmicas	-	0	-
	Mucosas ictéricas	4	5	7
	Mucosas pálidas	15	11	17
	Massa ou nódulo em pele	-	2	-
	Petéquias	2	-	-
	Aumento e assimetria nasal	-	1	-
Respiratório	Dispneia	-	15	-
	Epistaxe	-	1	-
	Esterotor	-	1	-
	Taquipneia	4	2	5
Temperatura corporal	Hipotermia	2	2	5
Outros	Abaulamento abdominal	-	2	1

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A anemia não foi a única alteração hematológica observada nos felinos diagnosticados com AHCI nos dois grupos. No grupo FeLV⁺P, em 92,3% (12/13) dos casos as citopenias foram observadas em duas ou mais linhagens de células, sendo a linhagem eritrocitária (100%) e plaquetária as mais afetadas (66,7%). Em somente um caso foi observada alteração eritrocitária única. No grupo FeLV⁺R, em todos os casos foi observada citopenia em duas linhagens celulares, foram: anemia arregenerativa normocítica e normocrômica (VG: 8%; contagem de reticulócitos: 0/ μ L), acompanhada por neutropenia (neutrófilos segmentados: 751/ μ L), no gato que veio a óbito; anemia arregenerativa macrocítica e normocrômica (VG: 10%; contagem de reticulócitos: 46860/ μ L), acompanhada de trombocitopenia (contagem de plaquetas: 65x10³/ μ L), no gato que sobreviveu. As alterações hematológicas nos animais com AHCI podem ser observadas na Tabela 13.

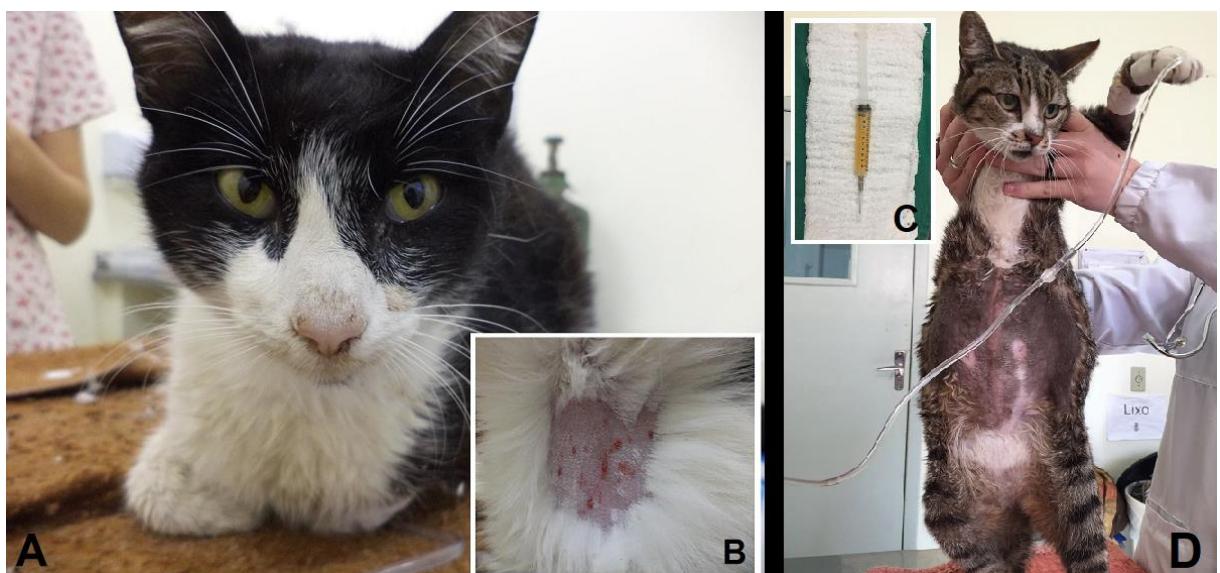
Tabela 13 — Hemograma dos gatos com infecção progressiva e regressiva por FeLV diagnosticados com leucemia e alteração hematológica de causa indeterminada (AHC).

Variável hematológica	Leucemia Md (25-75%)	A. H. C. I. Md (25-75%)	Intervalo referência ¹	Alterações Hematológicas	Leucemia n=20	A. H. C. I. n=15
Eritrócitos (x10 ⁶ /µL)	1,8 (1,4-2,4)	1,42 (1,1-1,9)	5,0-10,0	Anemia A.N.N	9	5
Reticulócitos (x10 ³ /µL)	0,5 (0-4,0)	0 (0-9,7)	≥65,00	Anemia A.N.H	0	1
Hemoglobina (g/dL)	3,4 (2,3-4,1)	2,6 (2-3,8)	8,0-15,0	Anemia A.M.N	10	7
VG (%)	10 (7-14,5)	8 (6-10,75)	24-45	Anemia R.M.H	0	1
VGM (fL)	56,3 (51,5-61)	56,6 (47,5-72)	39,0-55,0			
CHCM (g/dL)	34,2 (32-36,6)	35 (32-36,6)	30,0-36,0	Anemia R.M.N.	0	1
Plaquetas (x10 ³ /µL)	147 (87-228)	152 (75-281)	300-800	Trombocitose	1	0
				Trombocitopenia	16	10
Leucócitos (x10 ³ /µL)	28,1 (12-45,1)	8,8 (3,2-11)	6,0-17,0	Leucocitose	12	1
				Leucopenia	2	4
N. Miel. (x10 ³ /µL)	0 (0-0)	0 (0-0)	*	Neutrofilia D. E. R.	4	0
N. Metam. (x10 ³ /µL)	0 (0-0,43)	0 (0-0)	*	Neutrofilia D. E. D	1	0
N. Bast. (x10 ³ /µL)	0,24 (0-0,78)	0 (0-0,1)	0-0,3	Neutrofilia madura	0	1
N. Seg. (x10 ³ /µL)	3,9 (2,4-13,4)	2,9 (0,7-4,6)	2,50-12,50	Neutropenia	3	6
Linfócitos (x10 ³ /µL)	11 (2,4-36,2)	2,3 (1,6-5,1)	1,50-7,00	Linfocitose	14	1
				Linfopenia	1	2
Eosinófilos (x10 ³ /µL)	0 (0-0,2)	0 (0-0,01)	0-1,50	Eosinofilia	0	1
Basófilos (x10 ³ /µL)	0 (0-0)	0 (0-0)	*	Basofilia	2	1
Monócitos (x10 ³ /µL)	0 (0-0,2)	0,03 (0-0,1)	0-0,85	Monocitose	1	0
<hr/>						
C. de Howell-Jolly	-	-	-	-	4	7
Eritrócitos nucleados	-	-	-	-	10	8
Macroplaquetas	-	-	-	-	16	12
Plaquetas ativadas	-	-	-	-	2	2
Linf. pleomórficos	-	-	-	-	11	2
Linf. ativados	-	-	-	-	9	6
Neutrófilos tóxicos	-	-	-	-	1	1
Corpúsculos de Döhle	-	-	-	-	7	2
Monócitos ativados	-	-	-	-	1	0
<hr/>						
PTP (g/dL)	6,7 (6,3-7,4)	6,8 (6-7)	5,5-8,1	Plasma ictérico Hipoproteinemia Hiperproteinemia	6 2 3	7 1 1

A. H. C. I.: alteração hematológica de causa indeterminada; VG: volume globular; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; N.: neutrófilos; Miel.: mielócitos; Metam: metamielócitos; Bast.: bastonetes; Seg.: segmentados; E.: Eritrócitos; PTP: proteína total plasmática; ¹ intervalo de referência: (Weiss; Wardrop, 2010); * células incomuns na circulação sanguínea; Anemia A.N.N: anemia arregenerativa normocítica e normocrômica; Anemia A.N.H: anemia arregenerativa normocítica e hipocrômica; Anemia A.M.N: anemia arregenerativa macrocítica e normocrômica; Anemia R.M.H: anemia regenerativa macrocítica e hipocrômica; D.E.R.: desvio à esquerda regenerativo; D.E.D.: desvio à esquerda degenerativo; C.: corpúsculo. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Todos os diagnósticos de PIF foram obtidos por avaliação anatomo-patológica. Desenvolveram PIF efusiva 80,0% (4/5) dos gatos do grupo FeLV⁺P (Figuras 3 C e D) e a forma não efusiva 20,0% (1/5). Todos eram SRD, 80% (4/5) machos e 20% (1/5) fêmeas. Ao óbito tinham mediana de 25 meses de idade (variação: 11 a 44,2 meses). Os sinais clínicos apresentados foram: anorexia [100% (5/5)]; caquexia, apatia e abaulamento abdominal [80% (4/5)]; desidratação e emese [60% (3/5)]; diarreia [40% (2/5)]; anisocoria e ataxia [20% (1/5)]. Uma gata, SRD, com 10 meses, com anorexia, apatia, caquexia e diarreia foi diagnosticada no grupo FeLV⁺R, com a forma efusiva.

Figura 3 — A: gato, SRD, macho, com infecção progressiva por FeLV, apresentando palidez em plano nasal devido a anemia arregenerativa e (B) petéquias em região ventral de pescoço devido a trombocitopenia; C: Efusão abdominal coletada de uma gata, SRD, com infecção progressiva por FeLV, apresentando (D) aumento de volume abdominal em decorrência de Peritonite Infecciosa Felina (PIF).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Quanto as outras neoplasias nos grupos FeLV⁺P (n=4) e FeLV⁺R (n=1), todas foram diagnosticadas por exame anatomo-patológico. Foram diagnosticadas no grupo FeLV⁺P um caso de tumor maligno de bainha de nervo, caracterizado por dois nódulos ulcerados em pele, o maior medindo aproximadamente 10x8cm e o menor 2x3cm, abrangendo região ventral de pescoço. O diagnóstico, foi no momento da inclusão no estudo e o gato acometido era um macho, SRD e óbito com 37 meses de idade. Também foi diagnosticado um histiocitoma fibroso maligno. O felino, já com a neoplasia no momento da inclusão no estudo, era macho, SRD e

óbito com 19 meses de idade. O histiocitoma estava infiltrado em rins, pulmão, pâncreas e globo ocular esquerdo. Ainda, um fibroma em laringe, em um gato SRD, macho que faleceu com 108 meses de idade por complicações pós-operatórias após a excisão da neoplasia. Por último, um fibrosarcoma em laringe, em um felino SRD, macho, que veio a óbito com 43 meses de idade devido a PIF. No grupo FeLV⁺R foi diagnosticado um carcinoma de células escamosas (CCE) em pavilhão auricular de uma gata, SRD, que apresentou metástase em meninge resultando no seu óbito aos 96 meses de idade. O animal também era FIV positivo.

Os animais que vieram a óbito no grupo controle eram todos SRD, 60% (3/5) fêmeas e 40% (2/5) machos. Ao óbito tinham a idade mediana de 132 meses (variação: 93 a 144 meses), 60% (3/5) tinham o escore corporal regular e 40% (2/5) tinham baixo escore corporal, sendo um magro e outro caquético. A infecção fúngica relatada no grupo é uma criptococose diagnosticada por CAAF dos linfonodos mandibulares. Para os felinos que permaneceram vivos, aqueles com micoplasmosse e hepatopatia apresentaram recuperação do quadro e os demais permaneceram com as alterações até o final do estudo.

5.5.4 Controle do desfecho da infecção

Foram submetidos à um novo teste de ELISA e nested-PCR, 10,3% (12/116) dos animais do grupo FeLV⁺P e 46,7% (14/30) do grupo FeLV⁺R. Estes animais, tinham entre 14 e 56 meses de acompanhamento. Para o grupo FeLV⁺P, todos os animais permaneceram positivos em ambos os métodos diagnósticos. Para o grupo FeLV⁺R, 42,9% (6/14) se mantiveram positivos somente no nested-PCR e 57,1% (8/14) foram negativos em ambos os testes. Os resultados obtidos para cada indivíduo testado podem ser visualizados na Tabela 14.

Tabela 14 — Gatos com infecção progressiva pelo FeLV (FeLV⁺P) e regressiva (FeLV⁺R) submetidos ao ELISA e nested-PCR para controle de positividade: resultados obtidos, de acordo com o método diagnóstico, no momento da inclusão do felino no estudo versus final do acompanhamento clínico.

Felino	Momento do diagnóstico de FeLV			Vs.	Final do acompanhamento clínico			
	Doença	ELISA	Nested-PCR		ELISA	Nested-PCR	Doença	Óbito
F87	AHCI	+	+	30	+	+	AHCI	Sim
F149	Saudável	+	+	24	+	+	Saudável	*
F161	CGEF	+	+	51	+	+	CGEF/IRC	Não
F241	Úlcera de córnea	+	+	22	+	+	Linfoma	Sim
F260	Gastroenterite	+	+	48	+	+	Saudável	Não
F268	DTUIF	+	+	15	+	+	Leucemia	Sim
G32	AHCI	+	+	22	+	+	CGEF/FIV	Não
G46	Gastroenterite	+	+	19	+	+	CGEF	Não
G52	Saudável	+	+	15	+	+	Saudável	Não
G81	Saudável	+	+	15	+	+	Saudável	Não
G96	Saudável	+	+	15	+	+	Saudável	Não
G97	Saudável	+	+	16	+	+	Saudável	Não
F39	Saudável	-	+	56	-	-	Saudável	Não
F55	Trauma/FIV	-	+	26	-	-	FIV	*
F63	Saudável	-	+	40	-	-	Saudável	*
F67	Saudável	-	+	54	-	+	Saudável	Não
F147	Saudável	-	+	51	-	-	Saudável	Não
F158	Inf. bacteriana	-	+	51	-	-	Saudável	Não
F201	FIV	-	+	51	-	-	FIV	Não
F236	Saudável	-	+	27	-	-	Saudável	*
F245	Saudável	-	+	36	-	-	Saudável	Não
G12	AHCI	-	+	28	-	+	FIV	Não
G33	Linfoma	-	+	19	-	+	Linfoma	Não
G47	Saudável	-	+	14	-	+	Saudável	Não
G50	CGEF	-	+	14	-	+	CGEF	Não
G55	Saudável	-	+	17	-	+	Saudável	Não

Vs.: versus; Tempo: tempo em meses entre o momento do diagnóstico de FeLV e o controle ao final do acompanhamento clínico; *: perda de contato com o paciente após o último retorno; AHCI: alteração hematológica de causa indeterminada; CGEF: complexo gengivite estomatite felino; IRC: insuficiência renal crônica; DTUIF: doença do trato urinário inferior dos felinos. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

5.6 DISCUSSÃO

Este estudo permitiu determinar o impacto, à longo prazo, dos desfechos progressivo (FeLV⁺P) e regressivo (FeLV⁺R) da infecção natural por FeLV em uma população de gatos. Poucos estudos realizaram essa abordagem e aqueles que avaliaram o tempo de sobrevivência, geralmente, se concentram apenas no desfecho progressivo (ADDIE et al., 2000; STÜTZER et al., 2010; STÜTZER et al., 2011; ENGLERT et al., 2012; HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015; SPADA et al., 2018).

O grande número de óbitos observado neste estudo ocorreu, pois, a amostra se originou de uma população hospitalar, aonde a maioria dos felinos são levados ao hospital à procura de atendimento apresentando alguma alteração clínica. Além disso, grande parte dos gatos foram

diagnosticados com infecção progressiva, que é responsável por aumentar a mortalidade na população de felinos em consequência do desenvolvimento de doenças como o linfoma, a leucemia e a anemia arregenerativa (GLEICH et al., 2009; HARTMMAN, 2012; SPADA et al., 2018).

O baixo valor observado para o tempo mediano de sobrevivência no grupo FeLV⁺P resulta de características específicas da população avaliada. Em países desenvolvidos o diagnóstico de FeLV é realizado com o intuito de triagem em animais saudáveis (GLEICH et al., 2009; LITTLE et al., 2009; ENGLERT et al., 2012) e na população em questão, os felinos muitas vezes eram submetidos ao teste após a síndrome clínica relacionada ao FeLV já estar presente. Em estudos realizados na Alemanha e Itália, referentes a infecção natural por FeLV, o tempo mediano de sobrevivência para os felinos com infecção progressiva foram 10,4 a 23,8 vezes maior que o observado no presente estudo (GLEICH et al., 2009; SPADA et al., 2018).

Como 50% ou mais dos felinos dos grupos FeLV⁺R e controle permaneceram vivos dentro do período do estudo, os valores de mediana para as correspondentes curvas de sobrevivência não foram alcançados. Aparentemente, os felinos com infecção regressiva apresentam uma expectativa de vida comparada aos felinos negativos, apesar do valor de sobrevivência acumulativa ser inferior no grupo FeLV⁺R quando em comparação ao grupo controle. Não foram encontrados, na literatura científica consultada, estudos que avaliassem o efeito da infecção regressiva na expectativa de vida dos gatos infectados de forma natural. Em um estudo experimental, os gatos com infecção regressiva viveram mais que aqueles com infecção progressiva, em alguns casos sendo acompanhados por até 12 anos sem desenvolver doença associada ao FeLV (HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015).

O estado de saúde e o status positivo da infecção progressiva por FeLV foram as covariáveis que influenciaram na expectativa de vida dos felinos neste estudo. Estes fatores atuaram aumentando a razão de risco de óbito. É necessário ressaltar que não foi realizada segregação entre felinos doentes e saudáveis dentro dos grupos deste estudo e diversas doenças possuem cura quando tratadas de maneira adequada. Porém, quando a infecção progressiva por FeLV entra na equação, invariavelmente, a expectativa de vida reduz e poucos felinos permanecem vivos por longos períodos em consequência do desenvolvimento de doenças fatais (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997; ADDIE et al., 2000; SPADA et al., 2018). Apesar disso, dois felinos com infecção progressiva permaneceram vivos após mais de 4 anos de observação e na literatura consultada, existe o relato de um felino que permaneceu vivo por mais de 8 anos após o diagnóstico (SPADA et al., 2018).

Apesar da infecção regressiva não interferir na expectativa de vida dos felinos deste estudo, não se exclui a possibilidade do desfecho interferir diretamente na saúde destes animais. Na avaliação individual dos grupos, o estado de saúde aumentou o HR tanto dos animais como infecção progressiva quanto regressiva. Corroborando com estes resultados, estudos demonstram que felinos com infecção regressiva podem desenvolver doenças fatais que são comumente associação ao FeLV, entre elas as citopenias arregenerativas e o linfoma (JACKSON et al., 1993; GABOR et al., 2001; SUNTZ et al., 2010). Estas doenças são relatadas em associação ao desfecho regressivo com ocorrências variáveis, com alguns estudos indicando a falta de associação (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011; STÜTZER et al., 2011; WESTMAN et al., 2019). É necessário ressaltar que estes estudos datam de uma era pós-FeLV para os países em questão, que conseguiram por meio de medidas de controle e prevenção reduzir a prevalência para FeLV o que consequentemente reduz a transmissão e o número de animais com infecção regressiva (LOUWERENS et al., 2005; GLEICH et al., 2009; MEICHNER et al., 2012).

A coinfecção por FIV não teve influência significativa sobre o HR dos felinos do grupo FeLV⁺P, ao contrário do que foi observado em outro estudo, onde felinos FIV e FeLV progressivamente infectados tiveram 7,4 vezes mais risco de virem a óbito (SPADA et al., 2018). Uma diferença importante é que mesmo os gatos FIV e FeLV positivos, no estudo acima citado, tinham um tempo mediano de sobrevivência 13,2 vezes maior em comparação ao obtido para os FeLV progressivos do presente estudo. É provável que a coinfecção por FIV não tenha influenciado pois, o delineamento experimental utilizado e as características da população analisada selecionaram muitos animais que já apresentavam doenças relacionadas aos retrovírus.

A coinfecção por FIV não influenciou no HR dos felinos do grupo FeLV⁺R, o que pode ser explicado pois a infecção por FIV não influencia, na maioria das vezes, no tempo de sobrevivência (ADDIE et al., 2000; GLEICH et al., 2009; RAVI et al., 2010). Além disso, como o desfecho regressivo também não influenciou no HR, em conjunto as duas condições não tiveram efeito potencializador. Porém, nesse estudo houve um pequeno número de animais com infecção regressiva por FeLV e concomitantemente infectados por FIV, o que pode ter interferido nas análises. Além disso, o período de acompanhamento pode ter influenciado neste resultado, uma vez que a infecção por FIV é de evolução crônica e desfecho regressivo de FeLV parece ser mais prejudicial à saúde do felino a longo prazo (JACKSON et al., 1993; GABOR et al., 2001; RAVI et al., 2010; BEATTY et al., 2011).

Apesar de felinos mais jovens serem mais susceptíveis a infecção persistente pelo FeLV (HOOVER et al., 1976), o presente estudo não encontrou correlação entre a idade ao diagnóstico de FeLV e o tempo de sobrevivência. A maioria dos felinos, não importando a idade, já apresentava alguma doença correlacionada ao FeLV, o que pode ter contribuído para esse resultado. Em um estudo experimental, os gatos viveram em média 3,1 anos antes de desenvolverem doença associada ao FeLV e serem submetidos a eutanásia (HELPERRUNGERBUEHLER et al., 2015). Isso demonstra que o risco de ocorrência de óbito em animais com infecção progressiva por FeLV é acumulativo e depende do tempo que o indivíduo alberga o vírus. No estudo citado, o momento exato da infecção é estabelecido, mas quando se trata de infecção natural, como no presente estudo, isso pode ter ocorrido meses ou anos antes do momento do diagnóstico. Este fato, dificulta a análise temporal entre causa e efeito.

Nos casos em que a manifestação clínica responsável pelo óbito foi obtida, é possível observar diferença na distribuição da idade ao óbito dos felinos dentro de cada grupo. Enquanto os felinos FeLV⁺P faleceram entre os 7 meses a 6 anos de idade, os felinos controles eram mais velhos (7 anos a 12 anos). Outro estudo obteve resultados similares, onde 80% dos felinos FeLV positivos vieram a óbito até os 3,5 anos, enquanto somente 10% dos negativos o faziam (GLEICH et al., 2009).

Para o grupo FeLV⁺R, os felinos desenvolvem doenças neoplásicas tardivamente, sendo diagnosticadas na maioria das vezes em gatos acima de 7 anos de idade, enquanto felinos com infecção progressiva o fazem ainda jovens (JACKSON et al., 1993; GABOR et al., 2001; BEATTY et al., 2011). Este fato pode ser observado no presente estudo, exceto para o felino que desenvolveu linfoma. Os animais com leucemia no grupo FeLV⁺R foram classificados na faixa etária adulto ou geriátrica. O mesmo ocorreu para o felino com CCE, que é uma neoplasia diagnosticada comumente em felinos entre 9 e 10 anos (FOX, 1995). Poucos dados relacionados a faixa etária dos animais com anemia e infecção regressiva por FeLV são encontrados na literatura, em todos os casos os animais tinham mais de 6 anos de idade (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011). Outro felino também pertencia a faixa etária jovem, porém este foi diagnosticado com PIF, doença que comumente acomete felinos até 2 anos ou com mais de 7 anos de idade (RIEMER et al., 2015; TASKER, 2018).

Muitos animais no estudo apresentaram doenças concomitantes e uma das mais observadas foi CGEF, que é a doença mais comum da cavidade oral de gatos (ROLIN et al., 2016; THOMAS et al., 2017). No entanto, a frequência desta doença foi maior entre os felinos com infecção progressiva (FeLV⁺P). O FeLV, entre outros vírus e bactérias, já foi estudado como possível desencadeador do CGEF, mas os pesquisadores vêm encontrando dificuldade

em determinar uma relação causal consistente (QUIMBY et al., 2008; ROLIN et al., 2016; THOMAS et al., 2017). Os estudos demonstram resultados variáveis, desde ausência de gatos FeLV positivos no ELISA entre aqueles com CGEF, até 30,8% de FeLV positivos visualizados mediante imuno-histoquímica das lesões (QUIMBY et al., 2008; ROLIN et al., 2016). Não foi encontrado na literatura consultada o CGEF associado a infecção regressiva por FeLV (SUNTZ, 2010; BEATTY et al., 2011; HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Mesmo que o FeLV não se encontre diretamente relacionado ao desenvolvimento de CGEF, esta é uma condição clínica que pode atuar como disseminadora do vírus. A inoculação parenteral do FeLV por meio de mordidas parece ser uma forma eficaz de transmissão, não somente pela presença do vírus na saliva, mas também pela possibilidade de transferência de pequenas quantidades de sangue, especialmente se o gato agressor tiver doença periodontal significativa (GOLDKAMP et al. 2008; WESTMAN et al., 2017).

No que se refere as características individuais dos gatos com CGEF e infecção progressiva por FeLV, a faixa etária mais acometida pela doença (1-4 anos) difere dos dados obtidos na literatura, sendo o CGEF uma doença que ocorre mais em gatos acima de 6 anos (QUIMBY et al., 2008; ROLIN et al., 2016; THOMAS et al., 2017). É provável que esta diferença resulte no fato do CGEF ter sido um achado durante o exame clínico de gatos que apresentavam outras doenças relacionadas ao FeLV, como o linfoma e a leucemia, comuns nesta faixa etária (CRISTO et al., 2019 a,b).

Muitos animais apresentaram coinfeções por outros vírus e bactérias, sendo estas comuns em felinos com FeLV (HARTMANN, 2012). A infecção por FeLV facilita infecções oportunistas mediante mecanismos imunodepressores, causando linfopenia, resultante da replicação do vírus dentro dos linfócitos e atrofia tímica, e neutropenia com comprometimento na função quimiotática e fagocítica (REINACHER, 1989; LINENBERGER; ABKOWITZ, 1995; LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012). Estes fatores fazem com que as doenças infecciosas secundárias estejam entre as principais responsáveis das manifestações clínicas apresentadas pelos felinos FeLV positivos (HOFMANN-LEHMANN et al., 1997; ADDIE et al., 2000; HARTMANN, 2012; BIEZUS et al., 2019b), como observado no presente estudo devido ao número expressivo de animais que apresentaram pneumonia bacteriana e parasitária, outras infecções bacterianas, PIF e FIV.

Existem poucos estudos que permitem determinar uma relação causal entre infecções regressivas por FeLV e outras infecções secundárias. Um estudo obteve associação significativa para infecções bacterianas, entre outras doenças, em animais negativos para os抗ígenos gp70, p27 e positivos para a região U3 do FeLV exógeno em amostras de medula óssea (SUNTZ et

al., 2010). Estes resultados vão de encontro aos obtidos no presente estudo, onde infecções bacterianas, nos animais FeLV regressivos, ocorreram com frequências similares as de outras doenças associadas ao FeLV.

A pneumonia e a PIF foram as principais doenças infecciosas do estudo. A primeira, é considerada uma doença incomum em gatos (BARAL, 2012). Porém, um estudo que avaliou as causas de óbito e eutanásia em gatos na mesma região que o presente estudo, relatou um número expressivo de animais com esta afecção [5,83% (69/1184)], principalmente causada por bactérias [42,03% (29/69)] ou por parasitas [21,17% (15/69)] (WITHOEFT et al., 2019). A região em questão apresenta grande número de gatos com acesso à rua, que os expõe a agentes infecciosos, e alta prevalência de infecções por vírus imunodepressores como o FeLV (BIEZUS et al., 2019a).

A PIF foi uma doença com alta ocorrência no estudo, mas felinos foram diagnosticados com PIF do que com infecção concomitante por FIV. A correlação entre o coronavírus felino (FeCoV) e o FeLV vem sendo cada vez mais estudada na última década (POWERS et al., 2018; HAKAN; SERKAN, 2019). O FeCoV é um vírus comum entre os felinos, causando infecção crônica que se apresenta predominantemente de forma entérica e muitas vezes não patogênica, porém mutações o transformam em um vírus altamente patogênico resultando na PIF (SOMA; ISHII, 2003; TASKER, 2018). Como alguns fatores associados a infecção progressiva por FeLV são similares a PIF é esperada que ambas possam ser diagnosticadas simultaneamente, como demonstram por este e outros estudos (SOMA; ISHII, 2003; POWERS et al., 2018). Os fatores associados a ambas as infecções são o gênero masculino e a idade com ambos os vírus sendo comuns em animais com na faixa etária de 2 anos de idade, que vivem expostos a ambientes estressores e em habitações com vários gatos (GLEICH et al., 2009; RIEMER et al., 2015; TASKER, 2018; BIEZUS et al., 2019a). No que se refere ao FeLV, o principal questionamento é se este predispõe ao desenvolvimento de PIF em felinos infectados por (FeCoV) e até o momento não existem evidências que comprovem esta hipótese, mesmo no que diz respeito a infecções regressivas (SUNTZ et al., 2010; POWERS et al., 2018).

A coinfecção com *Mycoplasma* spp. foi umas das infecções bacterianas do grupo FeLV⁺R. Esta bactéria, não tem o nível de interação com o FeLV bem estabelecido e não foram encontrados, na literatura consultada, estudos que avaliassem o seu efeito especificamente em gatos com infecção regressiva por FeLV (TASKER et al., 2018). Porém, um estudo que avaliou a interação entre infecção progressiva por FeLV e *M. haemofelis* demonstrou que felinos concomitantemente infectados desenvolviam anemias mais graves, mas em todos os casos apresentava-se regenerativa com recuperação do paciente frente a administração de tratamento

adequado (GEORGE, 2002). O estudo também demonstrou que a maioria dos gatos vinham a óbito por doenças relacionadas ao retrovírus, principalmente de distúrbios mieloproliferativos, como observado no presente estudo.

As neoplasias foram as doenças mais observadas neste estudo, principalmente o linfoma. Linfomas mediastinal e multicêntrico apresentam maior ocorrência em animais com FeLV, linfomas alimentares e extranodais também são relatados (CRISTO et al., 2019b; LEITE-FILHO et al., 2019). O óbito ocasionado pelo linfoma associado ao FeLV é mais comum nas faixas etárias jovem e adulto jovem (CRISTO et al., 2019b). A maioria dos felinos deste estudo podem ser classificados nestas faixas etárias (VOGTT et al., 2010).

As localizações dos linfomas extranodais se destacaram, principalmente o relato de dois casos de linfoma subcutâneo. Enquanto os linfomas nasais e de sistema nervoso central são comuns, o linfoma subcutâneo é raramente observado em gatos (TAYLOR et al., 2009). As duas primeiras apresentações anatômicas, também observadas neste estudo, são responsáveis por 46,3% e 10,1% dos casos de linfoma extranodais, estando associadas ao FeLV em 54% e 56,5% dos casos, respectivamente (MARIONI-HENRY et al., 2008; TAYLOR et al., 2009; SANTAGOSTINO et al., 2015). Já o linfoma subcutâneo é responsável por 4,5% dos linfomas extranodais no país e 3,4% no Reino Unido e a sua correlação com FeLV varia de 6,5% até 58,8% (TAYLOR et al., 2009; MEICHNER; BOMHARD, 2014; ROCCABIANCA et al., 2016 LEITE-FILHO et al., 2019).

A leucemia, segunda doença neoplásica de maior ocorrência, tem a associação com a infecção progressiva pelo FeLV bem consolidada (FRANCIS et al., 1979; ESSEX, 1982; TOTH et al., 1986). Um estudo, realizado na mesma região geográfica, demonstrou que as leucemias são mais comuns em gatos nas faixas etárias jovens e adultos jovem (CRISTO et al., 2019a), como aqui observado. A ocorrência de leucemias mieloides associadas ao FeLV foi menor que as linfoides, de 71,4% para 87,5%, respectivamente (CRISTO et al., 2019a), ao contrário do observado no presente estudo onde as leucemias mieloides tiveram maior ocorrência.

De maneira geral o linfoma e a leucemia tiveram baixa ocorrência nos felinos com infecção regressiva. Nestes casos, o potencial oncogênico do FeLV está associado a persistência de sequências de DNA proviral incorporados ao genoma do hospedeiro, associado à diminuição da vigilância imunológica das células com o envelhecimento (GABOR et al., 2001). Este fato, associado à pouca idade dos felinos do grupo FeLV⁺R e ao curto período de acompanhamento deste estudo, explica o resultado. Apesar disso, o felino FeLV⁺R diagnosticado com linfoma tinha pouca idade. Neste caso, além do FeLV, fatores genéticos podem estar envolvidos,

principalmente por ser um felino da raça Siamês (LOUWERENS et al., 2005; FABRIZIO et al., 2013). Ainda, para os animais deste grupo a leucemia ocorreu mais vezes que o linfoma. Um estudo demonstrou o inverso, que 18,6% dos linfomas de gatos negativos para o antígeno p27 apresentaram positividade para o DNA proviral, enquanto somente 3,5% dos casos de leucemia foram associados (GABOR et al., 2001).

Outras neoplasias também foram observadas nos animais com infecção progressiva, como o fibroma e o fibrossarcoma de cavidade oral. Esta é uma neoplasia comum em gatos, principalmente o fibrossarcoma dérmico, porém na cavidade oral de felinos é raro (FOX, 1995; MIKIEWICZ et al., 2019). A associação do fibrossarcoma com o FeLV já foi reportada, são geralmente tumores multicêntricos que acometem felinos jovens, no qual o FeLV deu origem a um vírus recombinante denominado vírus do sarcoma felino (FeSV) (BESMER et al., 1996). Já sua apresentação solitária, que pode ser observada na cavidade oral de gatos, ocorre tipicamente em animais mais velhos, é pouco metastático e raramente ocorre em gatos FeLV ou FeSV positivos (FOX, 1995; MIKIEWICZ et al., 2019).

As demais neoplasias observadas neste estudo não apresentam associação comprovada com o FeLV. O tumor maligno de bainha de nervo e o histiocitoma maligno são neoplasias incomuns em gatos e com poucas informações publicadas (TROST et al., 2008; SCHULMAN et al., 2009; CECCO et al., 2018), apesar disso existe o relato de um animal positivo para FeLV no ELISA que foi diagnosticado com neoplasia histiocitica (KRAJE et al., 2001). O CCE é considerado a neoplasia de pele com maior ocorrência entre os felinos (FOX, 1995) mas, não há evidências que o FeLV ou o FIV possam estar envolvidos na sua patogênese (CHU et al., 2019).

Assim como no presente estudo, outros demonstram que a anemia está entre as principais causas de óbito nos felinos com infecção progressiva por FeLV (REINACHER, 1989; SHELTON et al., 1990; SPADA et al., 2018). Existem mecanismos não neoplásicos envolvidos no aparecimento das anemias associadas ao FeLV, podendo ser citada a infecção primária das células tronco hematopoiéticas e das células do estroma que leva ao desenvolvimento de anemia arregenerativa (ABKOWITZ et al., 1987; WEISS, 2006; HARTMANN, 2012).

A anemia arregenerativa em associação ao FeLV geralmente é observada em casos de anemia aplásica, aplasia eritrocitária pura e síndrome mielodisplásica (MDS) (STÜTZER et al., 2010). A anemia aplásica ou aplasia de medula, como diagnosticada no presente estudo, é descrita em associação ao subgrupo FeLV-C, assim como a aplasia eritrocitária pura (RIEDEL et al., 1986; HISASUE, 2000). A anemia aplásica é caracterizada pela deficiência na produção

das linhagens eritroide, mieloide e plaquetárias na medula óssea, que por esse motivo se apresenta hipocelular e com seu tecido normal substituído por gordura (WEISS, 2006). Devido as alterações diretas na medula óssea, é observada clinicamente na forma de pancitopenias no sangue periférico, mas citopenias em somente duas linhagens celulares podem ser observadas (WEISS, 2006; OLSON e HOHENHAUS, 2019).

Para a aplasia eritrocitária pura, que neste estudo parece ter acometido somente um felino, a seletividade do subgrupo FeLV-C ao transportador *heme* FLVCR1 que é amplamente expresso em tecidos hematopoiéticos, causa anemia arregenerativa sem que outras citopenias estejam presentes (LINENBERGER; ABKOWITZ, 1995). O diagnóstico é obtido pela evidenciação da perda seletiva das unidades formadoras de colônias eritroides na medula óssea (OLSON; HOHENHAUS, 2019).

A MDS, caracterizada pela combinação de citopenias no sangue periférico, geralmente acomete duas ou mais linhagens celulares e é uma condição que precede a leucemia mieloide aguda (HISASUE et al., 2009). A maioria dos gatos com AHCI, aqui relatados, apresentavam citopenias em duas ou mais linhagens celulares. Estudos que avaliaram o perfil hematológico de gatos com MDS, observaram que a anemia estava presente em 84,6% a 94%, a trombocitopenia em 69,2% a 82% e a neutropenia em 31% a 76,9% (SHIMODA et al., 2000; HISASUE et al., 2001), resultados similares aos aqui obtidos. Além disso, alterações displásicas na morfologia das células também são observadas, entre elas o grande número de eritrócitos com Corpúsculo de Howell-Jolly, macroplaquetas e leucócitos pleomórficos (SHIMODA et al., 2000). A macrotrombocitose foi a alteração displásica mais observada e quando em conjunto com a trombocitopenia torna-se uma alteração frequente em felinos infectados pelo FeLV, principalmente aqueles que desenvolvem leucemia (BOYCE et al., 1986).

Dois casos de AHCI foram observados entre os FeLV⁺R, no entanto há poucos relatos de citopenias arregenerativas e a infecção regressiva por FeLV (STÜTZER et al., 2010). Nos casos relatados é comum a ocorrência de anemias arregenerativas com ausência total de reticulócitos (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011), o que não foi observado em um dos casos do presente estudo, em que o paciente apresentava uma leve regeneração. Além disso, em nenhum dos casos foi observado bi-citopenia (STÜTZER et al., 2010; BEATTY et al., 2011), como o presente estudo.

Apesar da presença de plasma ictérico em diversos animais do estudo, em somente um caso foi observada anemia regenerativa. A coinfecção por *Mycoplasma* spp., que apesar de não evidenciado no esfregaço sanguíneo, não pode ser descartada (TASKER, 2010). Além disso, a presença de anemia, seja ela regenerativa ou não, pode ser explicada pela anemia hemolítica

imunomediada causada pelo FeLV, que se desenvolve devido a expressão de抗ígenos estranhos na superfície das hemácias levando-as a destruição (KOHN et al., 2006). Nos casos em que a regeneração não está presente pode existir incapacidade da medula óssea em realizar eritropoiese devido a ação direta do vírus sobre as células tronco hematopoéticas (ABKOWITZ et al., 1987; WEISS, 2006; HARTMANN, 2012). Outra possibilidade que explicaria a existência de icterícia é o desenvolvimento de lipodose hepática secundária ao quadro de anorexia, gerada pela anemia (VALTOLINA; FAVIER, 2017).

Gatos que inicialmente testam positivo, tanto para o抗ígeno p27 quanto para próvirus de FeLV, podem fazer a transição para a infecção regressiva geralmente até 16 semanas após a infecção (LITTLE et al., 2020). Neste estudo, nenhum gato com infecção progressiva apresentou o desfecho regressivo com o passar do tempo. Outro estudo, que avaliou infecção natural por FeLV, demonstrou resultados semelhantes (WESTMAN et al., 2019). A hipótese é que nestes animais, a infecção por FeLV tenha sido detectada em uma fase mais avançada, onde o hospedeiro já tivesse desenvolvido uma resposta imune ineficaz culminando na infecção persistente (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007).

Em muitos gatos com infecção regressiva o DNA proviral não pôde mais ser detectado, isso ocorreu principalmente nos gatos submetidos aos controles após períodos mais longos de acompanhamento. O mesmo não foi observado em um estudo experimental, onde os gatos regressivos mantidos em ambiente controlado e sem exposição a animais virêmicos por mais de 6 anos, ainda tinham o FeLV detectável na maioria de seus tecidos (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Existem três possíveis explicações para os resultados aqui observados. A primeira hipótese é que com o passar do tempo alguns animais conseguem eliminar ou manter a população de células infectadas inativas e passam a assemelhar-se com gatos com infecção abortiva (TORRES et al., 2005). A segunda hipótese é que estes animais, se submetidos a novas colheitas em momentos diferentes, possam eventualmente apresentar resultados positivos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007; HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2010). Por último, não pode ser descartada a hipótese de que o nested-PCR não foi sensível o suficiente para detectar níveis de DNA proviral extraordinariamente baixos. Problema similar já foi relatado, onde múltiplos ensaios de PCR tiveram que ser executados a partir da mesma amostra para obter resultado positivo, indicando que as cargas próvirais estavam no limite de detecção do ensaio (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007). No presente estudo, as amostras correspondentes foram submetidas à contraprova e os mesmos resultados foram obtidos.

Apesar de não observada, a reativação da infecção para os animais com o desfecho regressivo ainda deve ser considerada (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007). Este risco seria

maior nos gatos acompanhados por um curto período, uma vez que o risco de reativação tende a diminuir com o passar dos anos após a infecção (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Porém, existe o relato de um felino que apresentou reativação após 8,5 anos da infecção por FeLV associada ao FIV (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2010). Três felinos deste estudo se encontram em condições similares, porém com 2 a 4 anos sem sinal de reativação.

5.7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o impacto devastador da infecção progressiva por FeLV e forneceu evidências do real impacto da infecção regressiva em uma população com elevadas prevalências para FeLV, onde não são estabelecidas, de maneira efetiva, medidas de controle e prevenção.

Por meio da análise de sobrevivência é possível concluir que a infecção progressiva por FeLV reduz a expectativa de vida dos felinos, enquanto a infecção regressiva não apresenta efeito direto sobre a curva de sobrevivência. A avaliação clínica permitiu demonstrar que apesar das alterações clínicas como linfoma, leucemia e anemia arregenerativa serem mais comuns em felinos com o desfecho progressivo, também são frequentes naqueles com infecção regressiva.

6 ARTIGO 3

6.1 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS SUBGRUPOS A E B DO *Feline leukemia virus* (FeLV) EM GATOS COM INFECÇÃO PROGRESSIVA E DIFERENTES TIPOS DE LINFOMA OU LEUCEMIA

6.2 RESUMO

Feline leukemia virus (FeLV) é classificado em três subgrupos principais: FeLV-A, B e C, sendo A e B comuns em gatos com linfoma e leucemia, as principais doenças desenvolvidas por felinos infectados por FeLV. Este estudo tem como objetivo identificar os subgrupos de FeLV A e B nos gatos com linfoma ou leucemia e a relação filogenética das sequências do gene *env* obtidas. Foram selecionados 26 gatos, 16 com linfoma e 10 com leucemia. A positividade para o FeLV foi determinada por meio dos métodos de ELISA, que detecta o antígeno p27 do FeLV, e nested-PCR para a detecção de DNA proviral da região U3-LTR e gene *gag*. Os animais positivos em ambos os testes, foram classificados com infecção progressiva e suas amostras de sangue foram submetidas a nested-PCR para amplificação do gene *env* e determinação dos subgrupos A e B. *Primers* internos foram sintetizados e seis amostras de FeLV-A e cinco de FeLV-B foram sequenciadas e os resultados foram utilizados para obtenção da árvore filogenética e estimativa de divergência evolutiva. Entre os gatos com linfoma 68,8% eram FeLV-A e FeLV-B positivos (FeLV-AB) e 31,2% (5/16) FeLV-A. Para os gatos com leucemia 70% (7/10) eram FeLV-AB e 30% (3/10) FeLV-A. Com relação a idade 50% dos gatos eram jovens, 30,8% jovem adulto e 19,2% adultos. Não tinham raça definida (SRD) 88,5% e 11,5% eram de raças puras, eram machos 42,3% e fêmeas 57,7%. Para os linfomas, 62,5% eram mediastinal, 31,3% multicêntrico e 6,3% extranodal. Quanto a classificação histológica, os linfomas linfoblásticos e de células pequenas não clivadas foram os mais observados. Para as leucemias, 30% foram do tipo linfoide aguda, 30% mieloide crônica e 40% mieloide aguda. A análise filogenética demonstrou que as sequências FeLV-A SC possui relação próxima com variante Arena, 36TTenv-16, Glasgow-1 e FeLV-81TTenv-1. As sequências FeLV-B SC são divergentes entre si e são similares ao *env* de FELV endógeno (enFELV). Conclui-se que FeLV-AB é prevalente nos gatos com linfoma e leucemia, e demonstra a diversidade genética envolvida na patogênese dessas neoplasias.

Palavras-chaves: medicina felina, retrovírus, FeLV-A, FeLV-B, neoplasias.

6.3 INTRODUÇÃO

O linfoma e a leucemia estão entre as principais doenças neoplásicas que afetam os gatos e no Brasil estão fortemente associadas à infecção pelo *Feline leukemia virus* (FeLV) (CRISTO et al., 2019a, b; LEITE-FILHO et al., 2019). O FeLV pertence ao gênero *Gammaretrovirus* da família Retroviridae (JARRETT, 1964). É composto por um RNA de fita simples que, na célula hospedeira, é transformado em DNA proviral e incorporado ao seu material genético (HOOVER e MULLINS, 1991). Por meio de ensaios de interferência viral e determinação das diferentes sequências do gene *env*, foram descritos cinco subgrupos para o FeLV, que são o FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D e FeLV-T (SARMA; LOG, 1971; JARRETT; RUSSELL, 1978; SUGAI et al., 2001; LAURING et al., 2002; MENDONZA et al., 2006; YUKARI ANAI et al., 2012; CHIU et al., 2018). Estes subgrupos surgem quando um gato é infectado previamente pelo FeLV-A que sofre mutação ou recombinação com sequências retrovirais endógenas (BENVENISTE et al., 1975; STEWART, 1986; CHIU et al., 2018).

Os subgrupos de FeLV possuem a capacidade de interagir com a célula hospedeira por meio de diferentes receptores, selecionando assim o seu potencial patogênico (LAURING et al., 2002; YUKARI ANAI et al., 2012; WILLETT; HOSIE, 2013; CHIU et al., 2018). Os três principais subgrupos são o FeLV-A, FeLV-B e FeLV-C (WILLETT; HOSIE, 2013). O FeLV-A é classificado como menos patogênico, uma vez que é identificado sozinho na maioria dos animais assintomáticos, porém em alguns casos pode estar associado ao desenvolvimento de linfoma (SHEETS et al., 1993; COELHO et al., 2008). O FeLV-B ocorre principalmente em gatos diagnosticados com linfoma e leucemia (SHEETS et al., 1993; AHMAD; LEVY, 2010). A infecção pelo FeLV-C está associada a existência de anemia arregenerativa grave (LINENBERGER e SHELTON, 1995).

Os tipos mais comuns de linfoma associados a infecção pelo FeLV são o mediastinal, o multicêntrico e os extranodais, tendo origem em células T e em menor frequência em células B (LOUWERENS, 2005; CRISTO et al., 2019a, b; LEITE-FILHO et al., 2019). A leucemia associada ao FeLV pode acometer tanto células mieloides quanto linfoides e está associada a um prognóstico desfavorável, mesmo quando comparada ao linfoma (HARTMANN, 2012).

Existem muitos estudos sobre influência dos subgrupos no desenvolvimento das doenças associadas ao FeLV, mas a maioria possui caráter experimental (JARRET; RUSSELL, 1978; PHIPPS et al., 2000a, b). Poucos estudos examinaram o impacto dos subgrupos na apresentação clínica desenvolvida em uma população de gatos com infecção natural (JARRET et al., 1978; SHEETS et al., 1993). No Brasil, somente um estudo investigou os subgrupos

prevalentes na população de gatos domésticos (COELHO et al., 2008). Este estudo, realizado no estado de Minas Gerais, encontrou somente o FeLV-B em associação ao FeLV-A.

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência dos subgrupos FeLV-A e FeLV-B em gatos com infecção progressiva que desenvolveram linfoma ou leucemia e a relação filogenética das sequências do gene *env* obtidas.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Seleção da amostra

Foram selecionados 26 gatos que vieram a óbito, entre novembro de 2015 e dezembro de 2019, devido a infecção progressiva por FeLV e consequente desenvolvimento de linfoma ou leucemia. Os animais eram provenientes da rotina de atendimentos do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do CAV-UDESC e tinham a infecção progressiva confirmada por meio do método ELISA, com o kit SNAP FIV/FeLV Combo Test® (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, Estados Unidos) e da técnica de nested-PCR para detecção de DNA proviral (MIYAZAWA e JARRET, 1997). Foram considerados somente os que tiveram diagnóstico definitivo de linfoma ou leucemia, comprovado por meio de exame histopatológico realizado no Laboratório de Patologia Animal (LAPA) do CAV-UDESC. Gatos que apresentaram infecção concomitante por FIV foram excluídos da análise.

6.4.2 Classificação dos linfomas e leucemias

Após o óbito, os felinos encaminhados ao LAPA (CAV/UDESC) foram submetidos a exame anatopatológico. Os linfomas foram inicialmente classificados de acordo com a sua localização anatômica em alimentar, mediastinal, multicêntrico e extranodal (VALLI et al., 2000). As amostras colhidas durante a necropsia foram submetidas à clivagem, acondicionadas em cassete e posterior processamento histológico de rotina. A partir dos blocos de parafina provenientes das amostras, foram confeccionadas lâminas histológicas para coloração padrão de Hematoxilina e Eosina. Para a classificação histológica foram seguidos os parâmetros instituídos pelo *National Cancer Institute Working Formulation* (NCIWF) adaptado de Robbins-Smith (1982). Os linfomas foram então classificados em células pequenas e células grandes, em comparação ao diâmetro dos eritrócitos, e o número de figuras mitóticas foram contados em 10 campos no maior aumento (x400) e convertidos em valores unitários por campo (/ 10).

A classificação histológica em leucemia mieloide aguda (LMA) ou leucemia linfoide aguda (LLC) seguiu os critérios citomorfológicos definidos pela *Frenche-American-British Cooperative Group* (BENNETT et al., 1985). A classificação em leucemia linfoide crônica (LLC) e mieloide crônica (LMC) foi realizada de acordo com a literatura atual (VALLI et al., 2017).

6.4.3 Colheita dos dados epidemiológicos

O prontuário clínico de cada felino foi analisado para a obtenção dos dados. Foram consideradas as seguintes variáveis: idade, raça e gênero. Quanto a idade especificamente os gatos foram classificados por estágio de vida como: filhotes (0 a 6 meses), jovem (7 meses a 2 anos), jovem adulto (3 a 6 anos), adultos (7 a 10 anos), sênior (11 a 14 anos) e geriátricos (> 15 anos), de acordo com as Diretrizes de Estágios de Vida estabelecidas pela *American Association of Feline Practitioners* e *American Animal Hospital Association Feline Life Stage Guidelines* (VOGTT et al., 2010). Quanto a raça, os felinos foram classificados como sem raça definida (SRD) ou raças puras.

6.4.4 Obtenção e processamento das amostras

Foram utilizadas amostras de DNA, previamente acondicionadas a -20°C, extraídas a partir de sangue total por meio de kit comercial *GeneElute™ Blood Genomic DNA* (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas e a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) e diluídas para manter-se à concentração de 20ng/µL a 100ng/µL.

6.4.5 Determinação dos subgrupos de FeLV

As amostras de DNA foram submetidas a nested-PCR para a detecção do subgrupo viral. A nested-PCR foi realizada conforme a técnica adaptada de Hang Chen e colaboradores (1998). Para a primeira reação foi utilizado um par de *primers* externos que reconhecem a sequência de junção entre os genes *pol/env* (*start codon*) e sequência na região U3-LTR que são conservadas na maioria dos FeLV exógenos. Para a determinação dos subgrupos FeLV-A e FeLV-B, 1uL do produto do primeiro PCR foi utilizado em cada nova reação. Para FeLV-A foram utilizados

como *primers* internos RB59 e RB17 que originam um produto de amplificação de 1072 bp (DONAHUE et al., 1988; SHEETS et al., 1993; HANG CHEN et al., 1998; COELHO et al., 2008). Para FeLV-B foram utilizados como *primers* internos RB53 e RB17 que originam um produto de amplificação de 866 bp (KUMAR et al., 1989; SHEETS et al., 1993; MATHES et al., 1994; PAN et al., 2005; COELHO et al., 2008).

Para a primeira reação de PCR foram utilizados 1 μ L do DNA extraído [20-100ng/ μ L], 2 μ L do primer *forward* [10 μ M], 2 μ L do primer *reverse*, 1 μ L do mix dNTP [10mM] (dNTP Set, 100mM PCR Grade; Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) 28,75 μ L de água livre de nucleases e os reagentes do *Kit GoTaq® G2 Hot Start Polymerase* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). O *software Tm for Oligos Calculator* (Promega Corporation), foi utilizado para nortear a temperatura de anelamento dos *primers*. As condições utilizadas para a reação em termociclador *LifePro Thermal Cycler* (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, província de Zhejiang, China) foram: desnaturação a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de anelamento a 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e 30 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a identificação do subgrupo A, 1 μ L do produto da primeira reação foi submetido as mesmas condições de reagentes, tempo e temperatura, à exceção do anelamento e da extensão. A temperatura utilizada no anelamento foi de 44°C e o tempo de extensão foi de 1 minuto e 10 segundos. Para a identificação do subgrupo B, 1 μ L do produto da primeira reação foi submetido também as mesmas condições de reagentes, tempo e temperatura, à exceção do anelamento e da extensão. A temperatura utilizada no anelamento foi de 50°C e o tempo de extensão foi de 55 segundos. Para todos os ensaios foram utilizados controles positivos e negativos (água ultrapura, livre de DNase) a cada reação.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5%, com a adição de *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc., Fremont, Califórnia, Estados Unidos) ao produto da PCR. Um padrão de massa molecular de DNA de 2,5Kb (DNA Ladder, Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) foi utilizado para confirmar da amplificação dos segmentos de interesse.

6.4.6 Obtenção dos controles positivos e dos oligonucleotídeos para sequenciamento do FeLV-A

Para obtenção dos controles positivos e para confirmar a especificidade da técnica de nested-PCR foram selecionadas uma amostra FeLV-A SC e uma FeLV-B SC para o

sequenciamento do gene *env*. Foram enviados 15 a 20 μ L de produto de PCR correspondente as reações para identificação dos subgrupos, juntamente com 2-3 μ L a 4,5pmol/ μ L de cada primer, para a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), onde foi realizada a purificação e o sequenciamento do DNA obtido.

Foi utilizando o sequenciador automático AB 3500 *Genetic Analyzer* equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems, Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Os DNA-moldes foram purificados com o reagente *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup* (Applied Biosystems, Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) e quantificados no equipamento *Nanodrop 2000 c* (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). Após foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de primer específico e 0,5 μ L do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *LGC XP Cycler* (Bioer, Tokyo, Japão), com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μ L de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection 3* (Applied Biosystems, Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) com os parâmetros *Dye Set “Z”*; *Mobility File “KB_3500_POP7_BDTv3.mob”*; *BioLIMS Project “3500_Project1”*; *Run Module 1 “FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100”*; e *Analysis Module 1 “BC-3500SR_Seq_FASTA.saz”*. Os arquivos resultantes do *Data Collection* (.ab1; eletroferogramas) foram convertidos em arquivos FASTA (.seq; texto) pelo *Sequence Analysis Software v. 6* (Applied Biosystems) sob parâmetros padrões.

Especificamente para FeLV-A, devido ao tamanho do fragmento amplificado, *primers* internos foram acrescentados. Volumes de 2 a 3 μ L a 4,5pmol/ μ L foram enviados, juntamente com os *primers* correspondentes ao subgrupo, para garantir a qualidade do sequenciamento.

Para a escolha dos *primers*, foram comparadas sequencias genômicas de FeLV-A Glasgow-1 (KP728112.1) e FeLV-B (JF957361.2) obtidas no *GenBank*. Foram determinadas regiões pouco conservadas entre FeLV-A e FeLV-B por meio do alinhamento das sequências genômicas dos genes *env* utilizando *software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics*

Analysis) versão X, que permitiu a escolha dos oligonucleotídeos e a divisão do gene *env* em dois fragmentos.

Foram sintetizados dois *primers*, *reverse* PDR e *forward* SDF. Para o primeiro fragmento do gene *env*, foi utilizado o primer *forward* RB59 (DONAHUE et al., 1988; SHEETS et al., 1993; HANG CHEN et al., 1998; COELHO et al., 2008) o *primer* reverse PDR para delimitar uma região de 276pb do gene. Para o segundo fragmento, o *primer* forward SDF, iniciando 84 pb dentro da região anterior e como *primer* reverse foi utilizado o RB17 (KUMAR et al., 1989; SHEETS et al., 1993; MATHES et al., 1994; PAN et al., 2005; COELHO et al., 2008). Os *primers* foram sintetizados pela *IDT-Integrated DNA Technologies* (Coralville, Iowa, Estados Unidos). Todos os *primers* utilizados neste estudo estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2—Descrição dos *primers* utilizados e tamanho dos amplicons gerados para identificação dos subtipos FeLV-A e FeLV-B.

Nome	sequência 5'-3'	Produto	Referência
exFeLV pró vírus U3-LTR; gag			
U3-F (1)	ACAGCAGAAGTTCAAGGCC	770pb	MIYAZAWA e JARRET,
G-R (1)	GACCAGTGATCAAGGGTGAG		1997
U3-F (2)	GCTCCCCAGTTGACCAGACT	600pb	
G-R (2)	GCTTCGGTACCAAACCGAAA		
exFeLV pró vírus pol/env; LTR			
pol/env-F6A-F	ACATATCGTCCTCTGACCAC	2372pb (FeLV-A)	HANG CHEN et al., 1998
LTR-F6A-R	GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT	2432pb (FeLV-B)	
FeLV-A			
RB59-F	CAATGTAAAACACGGGGC	1072pb	DONAHUE et al., 1988
RB17-R	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG		MATHES et al. 1994
FeLV-B			
RB53-F	CTCGATAACGGGAGCTAG	862pb.	KUMAR et al., 1989
RB17-R	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG		MATHES et al. 1994
Primers para sequenciar FeLV-A			
RB59-F	CAATGTAAAACACGGGGC	276pb	DONAHUE et al., 1988
PDR	CATTTCCCTCACAGCTATTGTC		Posição: 6519-6541*
SDF	GAGAACCTGGTCCAAG	884pb	Posição: 6454-6470**
RB17-R	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG		MATHES et al. 1994

* Sequência do Genbank: KP728112.1; ** Sequência do Genbank: KP728112.1. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

6.4.7 Análise filogenética

Foram selecionadas seis amostras FeLV-A SC e cinco amostras FeLV-B SC para o sequenciamento do gene *env*. Foram enviados 15 a 20 μ L de produto de PCR correspondente as reações para identificação dos subgrupos, juntamente com 2-3 μ L a 4,5pmol/ μ L de cada *primer*, para a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada, RS, Brasil) onde foi realizada

a purificação e o sequenciamento do DNA obtido por meio do método de Sanger (SANGER et al., 1977). Os primers utilizados para amostras FeLV-A SC foram RB59 e PDR, SDF e RB17. Para as amostras FeLV-B SC os primers foram RB53 e RB17.

Os resultados dos sequenciamentos foram editados por meio do *software BioEdit Sequence Alignment Editor*. Todas as sequências obtidas foram comparadas, por meio da ferramenta *Nucleotide BLAST™* (*basic local alignment search tool*), com outras sequências do gene *env* do FeLV disponíveis no *GenBank* e usadas para a análise filogenética. As sequências correspondentes ao FeLV-B também foram comparadas com sequências A1-enFeLV (AY364318.1) e A2-enFeLV (AY364319.1) do FeLV endógeno (enFeLV) e uma sequência do gene *env* de um retrovírus murino (Z11128) foi utilizado como grupo externo na construção da árvore filogenética.

As relações filogenéticas, baseadas no alinhamento de nucleotídeos de sequências parciais de *env*, foram deduzidas usando o método baseado em distância (algoritmo *Neighbor-Joining*) e o método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood*, MLE) implementados no *software MEGA* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão X. O modelo adequado de substituição de nucleotídeos foi identificado no *MEGA-X* e no *software jModelTest 2* (DARRIBA et al., 2012; KUMAR et al., 2018). A construção da árvore foi realizada utilizando o método MLE com o modelo Tamura-Nei + G (TAMURA e NEI, 1993), com *bootstrap* de 1000 repetições.

Para estimar a divergência evolutiva entre sequências de aminoácidos do gene *env* de FeLV-A e FeLV-B obtidos neste estudo foi utilizado o modelo distância par-a-par (*pairwise distance*) + *p-distance* implementados no *software MEGA-X*, para *p*<0,1 considera-se forte correlação e *p*>0,25 ausência de correlação (KUMAR et al., 2018).

6.4.8 Comissão de Ética no Uso de Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 5806100918).

6.5 RESULTADOS

Os resultados do nested-PCR do gene *env* indicou que 68,8% (11/16) dos gatos com linfoma eram FeLV-A e FeLV-B positivos (FeLV-AB) e 31,2% (5/16) eram somente FeLV-A. Para os gatos com leucemia 70% (7/10) eram FeLV-AB e 30% (3/10) somente FeLV-A. Os

dados de acordo com as variáveis epidemiológicas, diagnóstico e os subgrupos de FeLV podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 — Análise descritiva da amostra (n=26) de gatos com linfoma ou leucemia, de acordo com os subgrupos A e B de FeLV.

Variáveis	Linfoma %		Leucemia %		Total % (n=26)
	FeLV-AB (11)	FeLV-A (5)	FeLV-AB (7)	FeLV-A (3)	
Idade	Filhote	0	0	0	0
	Jovem	63,64 (7)	20,0 (1)	57,14 (4)	33,33 (1)
	Jovem adulto	27,27 (3)	40,0 (2)	28,57 (2)	33,33 (1)
	Adulto	9,09 (1)	40,0 (2)	14,29 (1)	33,33 (1)
	Sênior	0	0	0	0
	Geriatra	0	0	0	0
Raça	Raças puras	9,09 (1)	20,0 (1)	14,29 (1)	0
	SRD	90,91 (10)	80,0 (4)	85,71 (6)	100,0 (3)
Gênero	Macho	36,36 (4)	0	71,43 (5)	66,67 (2)
	Fêmea	63,64 (7)	100,0 (5)	28,57 (2)	33,33 (1)

SRD: sem raça definida. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Entre os linfomas observados, 62,5% (10/16) eram mediastinal, 31,2% (5/16) multicêntrico e 6,2% (1/16) extranodal, sendo este localizado na medula espinhal. A classificação histológica e anatômica dos linfomas, de acordo com o subgrupo de FeLV pode ser observada na Tabela 16.

Tabela 16 — Distribuição dos linfomas em gatos de acordo com a forma anatômica, grau de malignidade, classificação histológica e os subgrupos A e B de FeLV.

Classificação histológica	Classificação anatômica dos linfomas e subgrupos de FeLV						Total %	
	Mediastinal		Multicêntrico		Extranodal			
	FeLV-AB	FeLV-A	FeLV-AB	FeLV-A	FeLV-AB	FeLV-A		
Grau intermediário								
Linfoma misto de células pequenas e grandes	6,25	-	12,50	-	-	-	18,75 (3)	
Alto grau								
Linfoma de células pequenas não clivadas	31,25	-	-	-	-	-	31,25 (5)	
Linfoma imunoblástico	-	6,25	-	6,25	-	-	12,50 (2)	
Linfoma linfoblástico	12,50	6,25	6,25	6,25	-	6,25	37,50 (6)	
Total; % (n)	50,0 (8)	12,5 (2)	18,75 (3)	12,5 (2)	-	6,25 (1)	100 (16)	

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para os casos de leucemia, 40% (4/10) foram do tipo mieloide aguda, 30% (3/10) mieloide crônica e 30% (3/10) linfóide aguda. A classificação histológica de acordo com os subgrupos de FeLV podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 17 — Distribuição das leucemias em gatos com infecção progressiva por FeLV de acordo com a classificação histológica e os subgrupos A e B de FeLV.

Classificação histológica	Subgrupos de FeLV		Total; % (n)
	FeLV-AB	FeLV-A	
Leucemia linfóide			
Aguda	20,0	10,0	30,0 (3)
Leucemia mieloide			
Aguda	30,0	10,0	40,0 (4)
Crônica	20,0	10,0	30,0 (3)
Total; % (n)	70,0 (7)	30,0 (3)	100,0 (10)

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

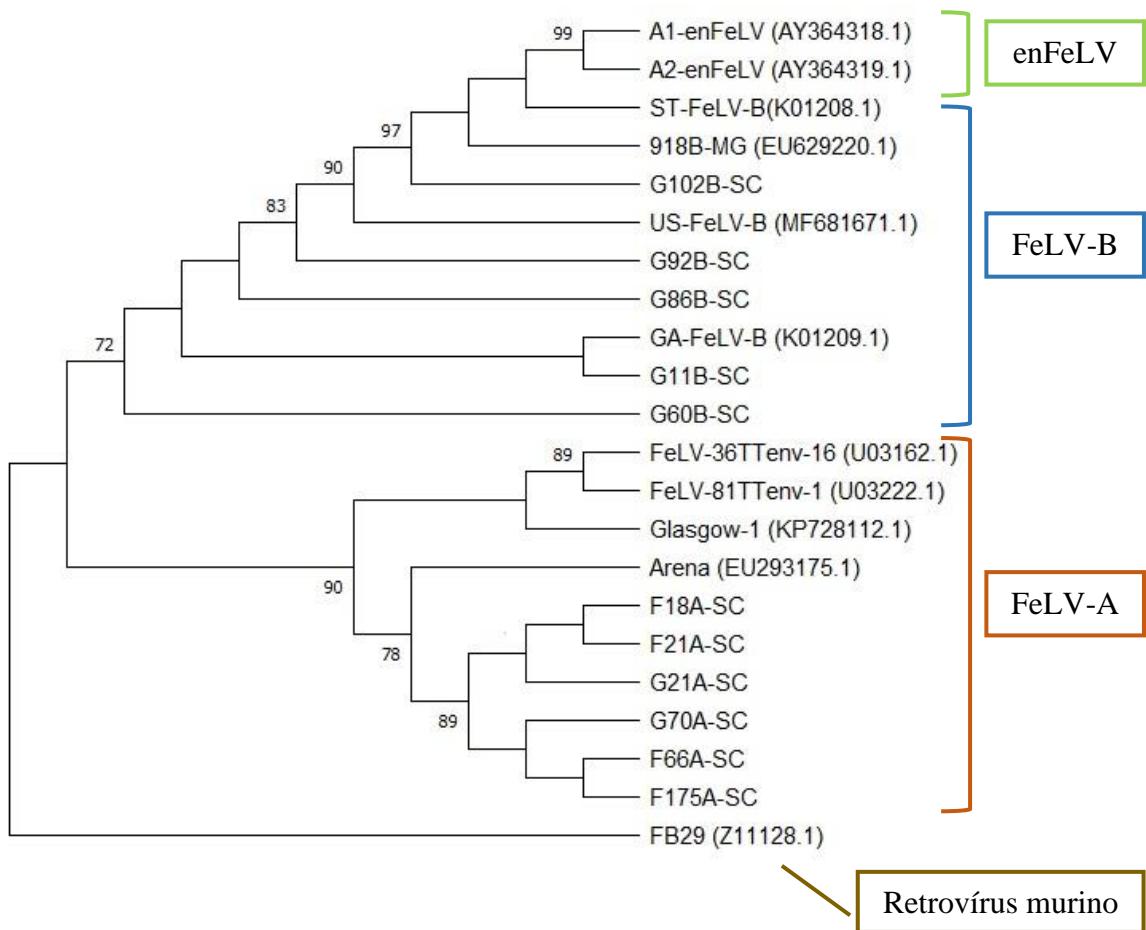
Os resultados das análises por meio da ferramenta *Nucleotide BLAST™* demonstraram que as sequências F21A-SC, F66A-SC e F175A-SC apresentam alta identidade (95-97%) com a variante de FeLV Arena (EU293175), F18A-SC com a variante 36TTenv-16 (FLU03162.1) (97%), G21A-SC com a variante Glasgow-1 (KP728112.1) (97%) e G70A-SC com a variante FeLV-81TTenv-1 (U03222.1) (95%). Ainda, as sequencias G11B-SC, G60B-SC e G86B-SC demonstraram alta identidade (98-99%) com a variante GA-FeLV-B (K01209.1), a sequência G92B-SC com a variante US-FeLV-B (MF681671.1) (94%) e a sequência G102B-SC com a variante 918B-MG (EU629220) (99%).

As sequencias G11B-SC, G60B-SC, G86B-SC e G92B-SC apresentaram baixa identidade (90-92%) com as sequências de enFeLV A1-enFeLV e A2-enFeLV, enquanto a sequência G102B-SC apresentou alta identidade (99% e 98%, respectivamente).

Por meio da análise filogenética foi possível observar que as sequências parciais de nucleotídeos correspondente ao gene *env* de F18A-SC, F21A-SC, F66A-SC, F175A-SC, G21A-SC apresentaram relação próxima entre si e com a variante Arena, indicando a existência de um ancestral comum. Ao mesmo tempo que, de maneira regressa, fazem parte de um grupo monofilético com as variantes 36TTenv-16, Glasgow-1 e FeLV-81TTenv-1 e por este motivo foram incluídas no subgrupo FeLV-A.

A sequência parcial de nucleotídeos correspondente ao gene *env* de G11B-SC apresenta relação próxima com a variante GA-FeLV-B, enquanto as demais sequências (G60B-SC, G86B-SC, G102B-SC e G92B-SC) estão filogeneticamente mais distantes dos grupos estudados, indicando um alto nível de divergência das sequencias. Estas sequências são agrupadas em um grupo monofilético entre elas e com as variantes US-FeLV-B, ST-FeLV-B e 918B-MG e por isso foram incluídas no subgrupo B. A árvore filogenética obtida e os subgrupos correspondentes podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4 — Árvore filogenética obtida a partir de sequências parciais do gene *env* do FeLV de gatos diagnosticados com linfoma e leucemia. Somente valores de bootstrap ≥ 70 são visualizados.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Ao comparar as sequências de aminoácidos obtidas a partir das sequências parciais do gene *env* de FeLV-A, FeLV-B e enFeLV foi possível observar que a sequência de FeLV-B G102B-SC é mais similar as variantes ST-FeLV-B e 918B-MG que as demais. As sequências G11B-SC, G60B-SC e G86B-SC divergem pouco entre si e a variante GA-FeLV-B. Ainda, a sequência G92B-SC foi a que apresentou maior divergência na sequência de aminoácidos em comparação as demais. Todas as sequências FeLV-B SC tiveram menor índice de divergências evolutivas em relação ao enFeLV que as FeLV-A SC. Ainda, é possível observar que as sequências FeLV-A SC são bastante similares entre si e entre as outras variantes de FeLV-A. Os resultados da análise para a distância entre pares podem ser observados na Tabela 18 (APÊNDICE C).

As sequências F66A-SC e G21A-SC eram de felinos diagnosticados no nested-PCR também com a presença de FeLV-B. Esses animais tinham linfoma multicêntrico misto de células pequenas e grandes (F66A-SC) e leucemia linfoide aguda (G21A-SC). As sequências F18A-SC, F21A-SC, F175A-SC e G70A-SC eram de felinos diagnosticados somente com FeLV-A no nested-PCR. Esses animais tinham linfoma linfoblástico extranodal (F18A-SC), leucemia linfoide aguda (F21A-SC), linfoma imunoblástico de células grandes no mediastino (F175A-SC) e linfoma multicêntrico linfoblástico de alto grau (G70A-SC). A sequência G11B-SC foi obtida de um gato com leucemia linfoide aguda e as sequências G60B-SC, G86B-SC, G92B-SC e G102B-SC de quatro gatos com linfoma de células pequenas não clivadas no mediastino.

6.6 DISCUSSÃO

A detecção de FeLV-A em todas as amostras, está de acordo com os resultados obtidos em outros estudos, de que o FeLV-A é o subgrupo comumente transmitido em infecções naturais e um pré-requisito para a instalação da infecção (JARRET e RUSSEL 1978; JARRET et al., 1978; DONAHUE et al., 1988; HANG CHEN et al., 1998; PHIPPS et al., 2000a; COELHO et al., 2008; ORTEGA et al., 2020). A observação de que FeLV-B ocorreu somente em conjunto com FeLV-A, reforça a hipótese de que a transmissão horizontal de FeLV-B isoladamente é um evento incomum, embora já tenha sido relatada (COELHO et al., 2008; STEWART et al., 2013; ERBECK et al., 2021).

O FeLV-B, em associação ao FeLV-A, apresentou maior ocorrência por se tratar de gatos diagnosticados com linfoma e leucemia, já que em felinos com estas doenças o FeLV-B é super-representado (JARRET et al., 1978; NEIL et al., 1991; AHMAD e LEVY, 2010). Estudos apontam que a ocorrência de FeLV-B pode apresentar uma grande variação (de 7% a 69%) (COELHO et al., 2008; SHINYA WATANABE et al., 2018; ORTEGA et al., 2020; ERBECK et al., 2021). Apesar de os gatos somente com FeLV-A não estarem livres de desenvolver neoplasias, a sua ocorrência é maior em felinos sadios (COELHO et al., 2008; ORTEGA et al., 2020), enquanto felinos com sinais clínicos da infecção são diagnosticados comumente com FeLV-B (AHMAD e LEVY, 2010; COELHO et al., 2008).

Diversos estudos demonstram que felinos de até 4 anos apresentam maior chance de estarem infectados com o FeLV (GLEICH e HARTMANN, 2009; CHHETRI et al., 2015; COSTA et al., 2017; BIEZUS et al., 2019a). Além disso, gatos que desenvolvem a infecção progressiva apresentam menos tempo de sobrevida, dificilmente chegando à idade adulta,

devido ao desenvolvimento de doenças relacionadas à infecção, principalmente o linfoma (ADDIE et al., 2000; HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Estes dados explicam por que felinos jovens e adultos jovens foram a maioria neste estudo.

O fato de FeLV-B ter sido detectado principalmente em felinos jovens, provavelmente, é resultado da maior mortalidade que está associada ao subgrupo, uma vez que este é diagnosticado em associação a doenças fatais como o linfoma (JARRET et al., 1978). Um estudo que avaliou a ocorrência de FeLV-A e FeLV-B em felinos no país observou que FeLV-B era predominante entre os gatos com sinais clínicos da infecção, enquanto os felinos FeLV-A eram saudáveis (COELHO et al., 2008). Além disso, animais que vêm a óbito por linfoma mediastinal, o principal tipo de linfoma associado ao FeLV-B (SHEETS et al., 1993; ROHN et al., 1994; TSATSANIS et al., 1994; AHMAD e LEVY, 2010) e o mais observado no presente estudo, são mais novos que para os demais tipos de linfoma (CRISTO et al., 2019b; LEITE-FILHO et al., 2019).

A maior ocorrência de gatos SRD neste estudo, está relacionada às características da população que a amostra se originou, que é composta principalmente por gatos SRD (BIEZUS et al., 2019a), o que pode estar influenciando na maior frequência destas doenças na raça. Além disso, outro estudo realizado no Brasil obteve que o risco de infecção progressiva por FeLV é maior em gatos SRD (COSTA et al., 2017) e mais um estudo relatou que estas mesmas doenças, quando em associação ao FeLV, apresentam maior incidência em animais SRD (CRISTO et al., 2019a, b).

A maioria dos gatos SRD deste estudo também foram FeLV-B positivos, mas se existe correlação com a raça, ainda não está bem definida. Um estudo que avaliou os níveis de transcritos de enFeLV não encontrou diferença na expressão entre gatos SRD e raças puras, no entanto, os níveis foram maiores nas raças Maine Coon e no Gato Selvagem Europeu (*Felis silvestris silvestris*) (TANDON et al., 2007). O nível de transcritos enFeLV expressos poderia atuar aumentando a probabilidade do surgimento do subgrupo B in vivo uma vez que é por meio de eventos de recombinação entre enFeLV e FeLV exógeno que emergem o FeLV do subgrupo B (WILLETT e HOSIE, 2013). Em adição, a avaliação de uma colônia de reprodução de híbridos de gato doméstico e gato-leopardo (*Felis bengalensis*) obteve uma incidência de FeLV-B superior a obtida na maioria dos estudos (COELHO et al., 2008; SHINYA WATANABE et al., 2018; ORTEGA et al., 2020; ERBECK et al., 2021), podendo sugerir efeito direto da raça.

Apesar do gênero masculino ser considerado um grupo de risco para a infecção por FeLV (GLEICH et al., 2009; AKHTARDANESH et al., 2010; BIEZUS et al., 2019a), as fêmeas

superam os machos em número total de ocorrências e entre os gatos com linfoma. Outros estudos encontraram resultado semelhante, sendo que o linfoma mediastinal e multicêntrico foram mais comuns no gênero feminino (VALLI et al., 2000; CRISTO et al., 2019b). Em comparação, em outro estudo realizado no Brasil, observou-se maior número de machos afetados (LEITE-FILHO et al., 2019). Para casos de leucemia, os machos foram maioria neste e em outro estudo realizado no país (CRISTO et al., 2019a). É importante ressaltar que os estudos que obtiveram resultados semelhantes no Brasil, foram realizados na mesma região geográfica, ou seja, os gatos foram submetidos a prevalências para a infecção e fatores associados similares (BIEZUS et al., 2019a; CRISTO et al., 2019a) e possivelmente a variantes do vírus semelhantes.

No que se refere ao subgrupo de FeLV, era esperado que a proporção de fêmeas positivas para FeLV-B fosse maior e não similar a proporção de machos. O nível de transcritos de enFeLV expressos em gatos machos é significativamente maior que nas fêmeas (ROCA et al., 2005; TANDON et al., 2007) e cargas mais elevadas de enFeLV pode ter efeito protetor, evitando o desenvolvimento de infecções progressivas em machos (POWERS et al., 2018). O mesmo estudo também observou que a presença de FeLV-B foi mais provável em gatas e estava correlacionada a cargas próvirais e virêmicas mais altas.

Os linfomas mediastinal e multicêntrico, com maior frequência neste estudo, estão altamente correlacionados a infecção por FeLV (CRISTO et al., 2019b; LEITE-FILHO et al., 2019). Além disso, a frequência de FeLV-B foi maior entre os casos de linfoma mediastinal. Os primeiros estudos realizados com a patogenia dos subgrupos FeLV-A e FeLV-B não demonstram correlação com tipos específicos de linfoma, sendo que os subgrupos foram observados tanto em linfoma tímico, quanto linfoma multicêntrico e alimentar (JARRET et al., 1978). Conforme outros estudos foram realizados, foi possível observar que FeLV-B é mais prevalente em linfomas tímicos, do que no linfoma multicêntrico (SHEETS et al., 1993; TSATSANIS et al., 1994; ROHN et al., 1994; AHMAD e LEVY, 2010). Muitos destes estudos foram realizados em gatos neonatos, inoculados com variantes de FeLV-A e por este motivo os dados obtidos referem-se a linfoma tímico e não linfoma mediastinal (ROHN et al., 1994; AHMAD e LEVY, 2010). Este órgão é bem desenvolvido no gato recém-nascido, mas após a maturidade sexual sofre involução (HAYES et al., 2000). Além disso, é possível que o termo linfoma tímico seja um sinônimo ao termo linfoma de mediastino em alguns artigos (JARRET et al., 1978; SHEETS et al., 1993; TSATSANIS et al., 1994).

Entre os linfomas de mediastino, a alta frequência de linfoma de células pequenas não clivadas foi observada neste e em estudos anteriores (VALLI et al., 2000; CRISTO et al.,

2019b). Sugerindo inclusive, que a alta frequência deste tipo de linfoma seja devido a uma possível origem tímica (VALLI et al., 2000). Para todos os gatos diagnosticados no presente estudo com este tipo de linfoma, o FELV-B foi detectado o que corrobora com os dados discutidos até o momento.

Linfomas de alto grau de malignidade como o linfoma de células pequenas não clivadas, imunoblástico e linfoblástico, que aqui foram os de maior representatividade, já foram associados em estudo anterior a infecção por FeLV (VALLI et al., 2000). Em contrapartida, um estudo realizado no país relatou maior ocorrência de linfoma de grau intermediário associado ao FeLV, sendo o linfoma misto de células pequenas e grandes o mais relatado (CRISTO et al., 2019b). No presente estudo, este foi o único tipo de linfoma de grau intermediário observado.

No presente estudo a maioria dos casos de leucemia foram diagnosticadas em felinos FeLV-AB, principalmente as leucemias mieloides. A maior ocorrência de leucemia mieloide também foi observada em outro estudo no país, que demonstrou alta associação com a positividade para FeLV (CRISTO et al., 2019a). Estudos anteriores demonstraram que até 90% das leucemias mieloides eram correlacionadas ao FeLV, enquanto para as leucemias linfoides a prevalência era de até 68% (FRANCIS et al., 1979; ESSEX, 1982; TOMIYASU et al., 2018). Ainda, um estudo que inoculou a variante FeLV-AB/GM-1 em felinos recém-nascidos observou que 50% desenvolveram leucemia mieloide, enquanto 16,7% desenvolveram aplasia e 33,3% permaneceram saudáveis até o final do estudo (TOTH et al., 1986).

A variante de FeLV Arena, que apresentou maior relação com as sequências FeLV-A SC, foi obtida em um lince-ibérico (*Iberian lynx*) de vida livre que morreu por atropelamento no Sul da Espanha (MELI et al., 2009). A sequência de nucleotídeos referida tinha 97,4% de identidade com a variante FeLV-A Rickard (AF052723), que é uma variante patogênica e quando inoculada em gatos recém-nascidos foi responsável pelo desenvolvimento de linfoma tímico de linfócitos T em 38,5% (5/13), anemia arregenerativa em 15,4% (2/13) e linfoma multicêntrico de linfócitos B em 7,7% (1/13) dos felinos (HANG CHEN et al., 1998; PHIPPS et al., 2000b).

As variantes 36TTenv-16, 81TTenv-1, das quais as sequências F18A-SC e G70A-SC tiveram maior identidade, foram identificadas após a infecção experimental de felinos de oito semanas de idade com clones de FeLV-A 61E, que por sua vez teve origem da infecção experimental de gatos com FeLV-FAIDS (OVERBAUGH et al., 1992; ROHN et al., 1994). O FeLV-FAIDS é uma variante imunogênica do FeLV-A, que apresenta *in vitro* efeito citopático em linfócitos-T e *in vivo* compromete acentuadamente a resposta imune do hospedeiro (QUACKENBUSH et al., 1996). Ambos os animais que apresentaram as variantes 36TTenv-

16, 81TTenv-1 desenvolveram linfoma tímico (ROHN et al., 1994), diferente do presente estudo em que desenvolveram linfoma multicêntrico e linfoma extranodal.

A sequência G21A-SC apresentou alta identidade com a variante Glasgow-1, que por sua vez, possui patogenia variável (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Esta variante vem sendo extensamente estudada (LEHMANN et al., 1991; HOFMANN-LEHMANN et al., 2006, 2007; TANDON et al., 2008) e apresenta diversos resultados para a infecção progressiva, desde gatos que desenvolveram linfoma (70%), principalmente linfoma tímico, leucemia (15%), entre elas a leucemia linfoide aguda, como no presente estudo, e anemia arregenerativa (15%) (HELPFER-HUNGERBUEHLER et al., 2015).

O baixo índice de divergências evolutivas entre as sequências de aminoácidos das amostras FeLV-A SC e as demais sequências FeLV-A comparadas, confirma a relação filogenética obtida. Estudos realizados recentemente demonstraram resultados similares, onde as sequências FeLV-A foram altamente semelhantes (ORTEGA et al., 2020; ERBECK et al., 2021). No Brasil, um estudo realizado no estado de Minas Gerais, demonstrou que o alinhamento das sequências de aminoácidos de FeLV-A apresentou alta identidade com FeLV-A Rickard, FeLV-FAIDS e Glasgow-1 (COELHO et al., 2008). Ainda na América do Sul, outro estudo demonstrou sequência similar à FeLV-FAIDS (ORTEGA et al., 2020). As variantes das quais os referidos estudos tiveram sequências similares, parecem estar associadas ao processo evolutivo das sequências aqui relatadas.

Em comparação a FeLV-A, as sequências de FeLV-B apresentaram maior índice de divergências evolutivas entre si e a formação de vários clados na árvore filogenética. Resultados também obtidos por um estudo que detectou grande número de eventos de recombinação entre FeLV-A e enFeLV no processo de surgimento de variantes FeLV-B (ERBECK et al., 2021). Segundo o autor acima citado, este fato contribui para a diversidade genética de FeLV-B e resulta em isolados que estão mais relacionados a FeLV-A, a enFeLV, ou intermediários entre as duas identidades. No presente estudo, as sequências G11B-SC, G60B-SC e G86B-SC podem ser consideradas intermediárias, enquanto a sequência G92B-SC e G102-SC pode ser considerada mais similar ao enFeLV.

O FeLV-B evolui *in vivo* a partir de FeLV-A, que sofre recombinação com sequências de *env* e U3 de enFeLV (STEWART et al., 1986; HANG CHEN et al., 1998). Isso explica o menor índice de divergências evolutivas entre as sequências FeLV-B SC e enFeLV, em comparação a FeLV-A e enFeLV. O percentual de identidade entre as sequências FELV-B SC e enFeLV foi similar ao observado em outro estudo no país que encontrou de 89 a 90% de identidade entre as sequências de nucleotídeos (COELHO et al., 2008), exceto para G102B-SC

que apresentou alta identidade (98-99%), levantando a suspeita de que o enFeLV possa ter sido detectado e não o FeLV-B. Porém, a sequência G102B-SC apresentou relação filogenética próxima também com as sequências 918B-MG e ST-FeLV-B, sequências estas que a exemplo de G102B-SC, demonstraram baixos índices de divergência evolutiva em comparação ao enFeLV. A variante ST-FeLV-B já foi comparada, juntamente com a variante GA-FeLV-B, com clones *env* enFeLV e foi observado que ST-FeLV-B apresentava maior homologia com enFeLV, chegando a 97% em algumas regiões (KUMAR et al., 1989). Em adição, um estudo que avaliou a filogenia e a diversidade estrutural de *env* de FeLV exógeno em felinos no Japão e detectou sequências de FeLV-B que foram quase inteiramente derivadas de *env* de enFeLV (SHINYA WATANABE et al., 2013). No estudo citado, a recombinação com FeLV exógeno só foi confirmada após a análise parcial das sequências *pol* e U3-LTR.

6.7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que o subgrupo FeLV-B em associação ao FeLV-A é prevalente em gatos com linfoma e leucemia secundário a infecção por FeLV, principalmente aqueles com linfoma mediastinal e leucemia mieloide. Apesar de FeLV-A ser considerado menos patogênico, pode ser encontrado isoladamente ao FeLV-B em felinos com linfoma e leucemia. Além disso, elenca os linfomas de alto grau de malignidade como os principais tipos de linfomas associados ao FeLV.

Com a análise filogenética das amostras foi possível concluir que, mesmo em um país com dimensões continentais como o Brasil, as sequências de FeLV obtidas até o momento parecem ter origem em três variantes específicas, a FeLV-A Rickard, FeLV-FAIDS e Glasgow-1.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido ao uso em conjunto de métodos diagnósticos voltados para a detecção de antígeno e a detecção de DNA proviral, este estudo permitiu determinar que a população de gatos do estado de Santa Catarina apresenta elevada prevalência e alto risco para a infecção por FeLV e é superior a encontrada em estudos que se baseiam somente na detecção da infecção progressiva. Desta maneira, demonstrando a importância da utilização do nested-PCR em adição ao ELISA para a triagem da infecção em animais com resultados discordantes ou em situações de risco como é o caso do Brasil, sendo um país com elevadas prevalências para FELV.

Foi possível definir os fatores associados aos desfechos da infecção por FeLV. Estes resultados, até então inéditos na literatura nacional e pouco descritos internacionalmente, fornecem embasamento científico para a caracterização de estratégias de controle e prevenção do FeLV em populações com elevada prevalência.

Por meio da avaliação hematológica de grande número de animais com infecção progressiva e regressiva por FeLV, foi possível determinar o impacto desses desfechos sobre os parâmetros hematológicos na espécie. Dessa maneira, fornecendo dados que são escassos, principalmente relacionados a infecção regressiva.

Por meio do acompanhamento clínico prolongado determinou-se o tempo de sobrevida e as alterações clínicas apresentadas em gatos após o diagnóstico de infecção progressiva e regressiva por FeLV, sendo este o primeiro estudo de análise de sobrevida da infecção por FeLV no Brasil. Os resultados obtidos oferecem importantes resultados sobre o impacto dos desfechos progressivo e regressivo da infecção por FeLV na saúde dos gatos, principalmente sobre desfecho regressivo do qual as informações na literatura são escassas.

Além disso, este é o primeiro estudo do país que atrelou os subgrupos de FeLV em animais com linfoma e leucemia e suas diferentes apresentações anatômicas e classificações histológicas. Demonstrando que o subgrupo FeLV-B é prevalente em gatos com linfoma mediastinal e leucemia mieloide e que as sequências de FeLV obtidas tem origem em três variantes específicas, a FeLV-A Rickard, FeLV-FAIDS e Glasgow-1.

Como perspectivas futuras, este estudo abre precedentes para maiores investigações em relação a infecção regressiva por FeLV. O acompanhamento prolongado destes felinos permitiria determinar o impacto deste desfecho na saúde dos gatos à longo prazo. Ainda, é

possível realizar um estudo epidemiológico voltado aos diferentes subgrupos de FeLV e determinar uma relação causal entre estes subgrupos e as diversas alterações clínicas apresentadas pelos felinos com infecção progressiva.

8 REFERÊNCIAS

ABKOWITZ, J. L.; HOLLY, R. D.; GRANT, C.K. Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. Hematopoietic progenitors are infected with feline leukemia virus and erythroid burst-forming cells are uniquely sensitive to heterologous complement. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, p. 1056–1063, 1987.

ACKLEY, C. D. et al. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5652-5655, 1990.

ADAM, F. et al. Clinical pathological and epidemiological assessment of morphologically and immunologically confirmed canine leukaemia. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, p. 181-195, 2009.

ADDIE, D. D. et al. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record**, v. 146, p. 419-424, 2000.

AHMAD, S.; LEVY, L. S. The frequency of occurrence and nature of recombinant feline leukemia viruses in the induction of multicentric lymphoma by infection of the domestic cat with FeLV-945. **Virology**, v. 403, p. 103–110, 2010.

ALMEIDA, N. R. et al. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, p. 583-586, 2012.

ALMEIDA, N. R. et al. Alterações clínicas e hematológicas em gatos domésticos naturalmente infectados pelo vírus da leucemia felina (FeLV). **Revista de Saúde**, v. 07, p. 27-32, 2016.

AKHTARDANESH, B. et al. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and toxoplasma gondii in stray and household cats in Kerman–Iran: Seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 306–310, 2010.

BANDE, F. et al. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia virus from naturally infected cats in Malaysia. **Veterinary Medicine International**, v. 1, p. 1-10, 2014.

BARAL, R. M. Lower respiratory tract diseases. In: Little, S.E. **The cat: Clinical Medicine and Management**. Missouri: Saunders. p. 861-891, 2012.

BARR, M. C. et al. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, p. 1377-1381, 1991.

BEATTY, J. A. et al. Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 927-933, 2011.

BENNETT, J. M. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British Cooperative Group. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, p. 620-625, 1985.

BENVENISTE, R. E.; SHERR, C. J.; TODARO, G. J. Evolution of type C viral genes: Origin of feline leukemia virus. **Science**, v. 190, p. 886-888, 1975.

BESMER, P. et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene vkit with the protein kinase gene family. **Nature**, v. 320, p. 415-421, 1986.

BIENZLE, D et al. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 753-757, 2004.

BIEZUS, G. et al. 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. p.17-21, 2019a.

BIEZUS, G. et al. Alterações clínicas e hematológicas em gatos com infecção natural e progressiva pelo vírus da leucemia felina (FeLV). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 16-29, 2019b.

BIEZUS, G. et al. Plasma Cell Pododermatitis Associated With Feline Leukemia Virus (FeLV) and Concomitant Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in a Cat. **Topics in Companion Animal Medicine**, v.41, 2020. Disponível em <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1938-9736\(20\)30073-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1938-9736(20)30073-8)>.

BLANCO, K. et al. Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 5, p. 661-663, 2009.

BLUE, J. T; FRENCH, T. W.; KRANZ, J. S. Non-lymphoid hematopoietic neoplasia in cats: A retrospective study of 60 cases. **Cornell Veterinarian**, v. 78, p. 21-42, 1988.

BOLIN, L. L.; LEVY, L. S. Viral determinants of FeLV infection and pathogenesis: lessons learned from analysis of a natural cohort. **Viruses**, v. 3, p. 1681-1698, 2011.

BOYCE, J. T. et al. Feline Leukemia Virus-Induced Thrombocytopenia and Macrothrombocytosis in Cats. **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 16-20, 1986.

BRASIL. Fundação instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa nacional de saúde: 2019: informações sobre domicílio, acesso e utilização dos serviços de saúde: Brasil, grandes regiões e unidades da federação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 78p.

CALLANAN, J. J. et al. Histologic classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 264-272, 1996.

CARMICHAEL, K. P; BIENZLE, D.; MCDONNELL, J. J. Feline leukemia virus associated myelopathy in cats. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 536-545, 2002.

CECCO, B. S. et al. Malignant peripheral nerve sheath tumor in a cat: cytological, histopathological, and immunohistochemical aspects. **Comparative Clinical Pathology**, v. 27, p. 803–806, 2018.

CHHETRI, B. K. et al. 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, p. 1–7, 2015.

CHIU, E. S.; HOOVER, E. A.; VANDEWOUDE, S. A retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: viral interference assays to deep sequencing. **Viruses**, v. 10, p. 29, 2018.

CHU, S. et al. A virome sequencing approach to feline oral squamous cell carcinoma to evaluate viral causative factors. **Veterinary Microbiology**, v. 240, e108491, 2019.

COELHO, M. F. et al. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2799–2805, 2008.

COELHO, M. F. et al. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis cattus* em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 778-783, 2011.

COURCHAMP, F. et al. Population dynamics of feline immunodeficiency virus within cat populations, **Journal of Theoretical Biology**, v. 175, p. 553–560, 1995.

COUTO C. G. Oncologia. In: NELSON R. W.; COUTO C. G. **Medicina interna de pequenos animais**, 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1189-1196, 2010.

COSTA, F.V.A. et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1531-1536, 2017.

COX, D. R. Regression models and life tables (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society: Series B**, v. 34, p. 187-220, 1972.

COX, D. R.; OAKES, D. **Analysis of Survival Data**. London: Chapman & Hall. 1984, 121p.

CRISTO, T. G. et al. Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina. Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 170, p. 10-21, 2019a.

CRISTO, T. G. et al. Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 20-28, 2019b.

CUNNINGHAM, M. W. et al. Epizootiology and management of feline leukemia virus in the Florida puma. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, p. 537–552, 2008.

DAY, M. J. et al. Recommendations on vaccination for Latin American small animal practitioners: a report of the WSAVA Vaccination Guidelines Group. **Journal of Small Animal Practice**, 2020. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7228315/pdf/JSAP-9999-na.pdf>>.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DEL FIERRO, G. M. et al. Quantification of lymph - adenopathy in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in domestic cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, p. 3-12, 1995.

DONAHUE, P. R. et al. Strong sequence conservation among horizontally transmissible minimally pathogenic feline leukemia viruses. **Journal of virology**, v. 62, p. 722-731, 1988

DUARTE, A. et al. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1061-1070, 2002.

DUNHAM, S. P. Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 67-77, 2006.

ENGLERT, T. et al. Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, p. 392-398, 2012.

ERBECK, K. et al. Feline Leukemia Virus (FeLV) Endogenous and Exogenous Recombination Events Result in Multiple FeLV-B Subtypes during Natural Infection. **Journal of Virology**, v. 95, e00353-21, 2021.

ESSEX, M. Feline leukemia: a natural occurring cancer of infectious origin. **Epidemiologic Reviews**, v. 4, p. 189-203, 1982.

FABRIZIO, F. et al. Feline mediastinal lymphoma: a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, p. 637-644, 2014.

FAN, H. Leukemogenesis by moloney murine leukemia virus: A multistep process. **Trends Microbiol**, v. 5, p. 74-82, 1997.

FIGUEIREDO, S. A.; ARAÚJO JUNIO, J. P. Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral. **Ciência Rural**, v.41, p.1952-1959, 2011.

FILONI, C. et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropic and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 166-173, 2012.

FOX, L. E. Feline cutaneous and subcutaneous neoplasms. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, p. 961-79, 1995.

FRANCIS, D. P. et al. Comparison of Virus-positive and Virus-negative Cases of Feline Leukemia and Lymphoma. **Cancer research**, v. 39, p. 3866-3870, 1979.

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, p. 1097-1104, 1998.

FUJINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 138-143, 2008.

GABOR, L. J. et al. Feline leukaemia virus status of Australian cats with lymphosarcoma. **Australia Veterinary Journal**, v. 79, p. 476-481, 2001.

GEORGE, J. H. et al. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1172-1178, 2002.

GAO, F. et al. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 72, p. 5680-5698, 1998.

GHOSH, S. K.; FALLER, D. V. Feline leukemia virus long terminal repeat activates collagenase IV gene expression through AP-1. **Journal of Virology**, v. 73, p. 4931-4940, 1999.

GLEICH, S. E; HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-Infected and feline leukemia virus-infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 552-558, 2009.

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

GOLDKAMP, C.E. et al. 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, p. 1152-1158, 2008.

GOMES-KELLER, M. A. et al. Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 916-922, 2006.

GREENE, C. G. **Infectious disease of the dog and cat**. Missouri: Elsevier, 3 ed. p. 105-131, 2006.

HAKAN, A; SERKAN, Y. Investigation of the relation between feline infectious peritonitis and retroviruses in cats. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 71-78, 2019.

HANG CHEN. et al. Pathogenicity induced by feline leukemia virus, rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA). **Journal of Virology**, v. 72, p. 7048-7056, 1998.

HARDY JUNIOR, W. D. et. al. Biology of Feline Leukemia Virus in the Natural Environment. **Cancer Research**, v. 36, p. 582-588, 1976.

HARTMANN, K. et al. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. **Veterinary Record**, v. 149, p. 317-320, 2001.

HARTMANN, K. Feline Leukaemia Virus Infection. In: GREENE, C. G. **Infectious disease of the dog and cat**. Missouri: Elsevier, 3 ed. p. 105-131, 2006.

HARTMANN, K. et al. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.9, p. 439-445, 2007.

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

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A Review. **Viruses**, v. 4, p. 2684-2710, 2012.

HARTMANN, K. Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, p. 925–939, 2015.

HARTMANN, K. Regressive and progressive feline leukemia virus infections – clinical relevance and implications for prevention and treatment. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.47, p. 109-S112, 2017.

HAYES, K. A. et al. Antiviral Therapy Reduces Viral Burden but Does Not Prevent Thymic Involution in Young Cats Infected with Feline Immunodeficiency Virus. **American Society for Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2399-2405, 2000.

HAWKS, D. M.; LEGENDRE, A. M.; ROHRBACH, B. W. Comparison of four test kits for feline leukemia virus antigen. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, p.1373-1377, 1991.

HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K. et al. Dominance of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma. **Retrovirology**, v.7, p. 14, 2010.

HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K. et al. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. **Virus Research**, v. 197, p. 37–150, 2015.

HERRING, E. S. et al. Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 133-141, 2001.

HISASUE, M. et al. Hematologic Abnormalities and Outcome of 16 Cats with Myelodysplastic Syndromes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 471–477, 2001.

HISASUE, M. et al. 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, p. 1133-41, 2009.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Recombinant FeLV vaccine: long-term protection and effect on course and outcome of FIV infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, p. 127-137, 1995.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Parameters of Disease Progression in Long-Term Experimental Feline Retrovirus (Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus) Infections: Hematology, Clinical Chemistry, and Lymphocyte Subsets. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 33-42, 1997.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1589-1596, 2001.

HOFMANN-LEHMANN, R., et al. Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. **Vaccine**, v. 24, p. 1087-1094, 2006.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. **Vaccine**, v. 25 p. 5531-5539, 2007.

HOOVER, E. A. et al. Biologic and immunologic response of cats to experimental infection with feline leukemia virus. **Bibliotheca haematologica**, v. 43, p. 180-183, 1975.

HOOVER, E. A. et al. Feline leukemia virus infection: age-related variation in response of cats to experimental infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, p. 365-369, 1976.

HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Feline leukemia virus infection and diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, p. 1287-1297, 1991.

HOSIE, M. J. et al. Feline Immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and surgery**, v. 11, p. 575-584, 2009.

ISHIDA, T. et al. Long-term clinical observations on feline immunodeficiency virus infected asymptomatic carriers. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 15-22, 1992.

JACKSON, M. L. et al. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 269-276, 1993.

JARRETT, W. F. H. et al. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, p. 567-569, 1964.

JERRETT, O.; RUSSEL P. H. Differential growth and transmission in cats of feline leukaemia viruses of subgroups A and B. **International Journal of Cancer**, v. 21, p. 466-472, 1978.

JARRETT, O. et al. The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. **The International Journal of Cancer**, v. 21, p. 334-337, 1978.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Non parametric estimation from incomplete observation. **Journal of the American Statistics Association**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KOHN, B.; WEINGART, C.; ECKMANN, V. et al. Primary immunemediated hemolytic anemia in 19 cats: Diagnosis, therapy, and outcome (1998–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 159–166, 2006.

KRAJE, A. C.; PATTON, C. S.; EDWARDS, D. F. Malignant Histiocytosis in 3 Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 252–256, 2001.

KUMAR, D. V.; BERRY, B. T.; ROY-BURMAN, P. Nucleotide sequence and distinctive characteristics of the env gene of endogenous feline leukemia provirus. **Journal of virology**, v. 63, p. 2379-2384, 1989.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KYAW-TANNER, M. T. et al. The induction of in vivo superinfection and recombination using feline immunodeficiency virus as the model. **Archives of Virology**, v. 138, p. 261–271, 1994.

LACERDA, L. C. et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-8, 2017.

LAFLAMME D. Development and validation of a body condition score system for cats: A clinical tool. **Feline Practitioners**, v. 25, p. 13-18, 1997.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1997.

LAURING, A. S. et al. Genetic and biochemical analyses of receptor and cofactor determinants for T-cell-tropic feline leukemia virus infection. **Journal of Virology**, v. 76, p. 8069-8078, 2002.

LEHMANN, R. et al. Vaccination of cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus, using a recombinant feline leukemia virus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, p. 1446–1452, 1991.

LEITE-FILHO, R. V. et al. Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, p. 224–230, 2020.

LERNER, D. L. et al. Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 92, p. 7480-7484, 1995.

LEVY, J. K. et al. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, p. 371–376, 2006.

LEVY, J. K. et al. 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. 231, p. 218-225, 2007.

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

LINENBERGER, M. L.; ABKOWITZ, J. L. Haematological disorders associated with feline retrovirus infections. **Baillibre's Clinical Haematology**, v. 8, p.73-112, 1995.

LINENBERGER, M. L.; SHELTON, G. H. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. **Seminars in veterinary medicine and surgery**, v. 10, p. 220-233, 1995.

LITTLE, S. et al. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. **Canadian Veterinary Journal**. v. 50, p. 644–648, 2009.

LITTLE, S. et al. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: Recommendations for testing and management. *The Canadian Veterinary Journal*, v.52, p. 849-855, 2011.

LITSTER, A. L. Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. **The Veterinary Journal**, v. 201, p. 184–188, 2014.

LITTLE, S. et al. 2020 AAFF feline retrovirus guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, p. 5-30, 2020.

LOPEZ, N.A. et al. Sensitivity and specificity of blood test kits for feline leukemia virus antigen. **Journal of the American Veterinarian Medical Association**, v. 195, p.747-751, 1989.

LOUWERENS, M. et al. Feline Lymphoma in the Post-Feline Leukemia Virus Era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 329-335, 2005.

LUCKMAN, C; GATES, M. C. Epidemiology and clinical outcomes of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in client-owned cats in New Zealand. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 19, p.1-9, 2017.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPINN, M. R. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 6, p. 287-296, 2004.

LUTZ, H. et al. Feline leukaemia: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 565-574, 2009.

MADEWELL B. R; JARRETT O. Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. **Veterinary Record**, v. 112, p. 339-42, 1983.

MAEDA. N.; FAN. H.; YOSHIKAI. Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, p. 387–405, 2008.

MAJOR, A. et. al. Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. **Veterinary Research**, v. 41, p. 1-10, 2010.

MARIKO KOHMOTO et al. Eight-Year Observation and Comparative Study of Specific Pathogen-Free Cats Experimentally Infected with Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Subtypes A and B: Terminal Acquired Immunodeficiency Syndrome in a Cat Infected with FIV Petaluma Strain. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 315-321, 1998.

MARIONI-HENRY K. et al. Tumors affecting the spinal cord of cats: 85 cases (1980–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 237-243, 2008.

MARTINS, A. N. et al. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-native cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 7863–7874, 2008.

MATHES, L. E. et al. Pathogenicity of a subgroup C feline leukemia virus (FeLV) is augmented when administered in association with certain FeLV recombinants. **Virology**, v. 198, p. 185-195, 1994,

MEDEIROS, O. et al. Natural transmission of feline immunodeficiency virus from infected queen to kitten. **Journal of Virology**, v. 9, p. 99, 2012.

MEICHNER, K. et al. Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. **Veterinary Record**, v. 171, p. 348, 2012.

MEICHNER, K.; von BOMHARD, W. Patient characteristics, histopathological findings and outcome in 97 cats with extranodal subcutaneous lymphoma (2007–2011). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, p. 8-20, 2014.

MELI, M. L. et al., Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **PLoS One**, v. 4, p. 4744, 2009.

MENDONZA, R.; ANDERSON, M. M.; OVERBAUGH, J. A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3378–3385, 2006.

MOLINA, V. M. et al., Frequency of feline immunodeficiency virus (FIV) in southern Aburrá Valley, Colombia (2013-2015). **Revista Científica**, v. 26, p. 374-378, 2016.

MÖSTL, K. et al., Update of the 2009 and 2013 ABCD guidelines on prevention and management of feline infectious diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, p. 570-582, 2015.

MIKIEWICZ, M. et al. Canine and feline oral cavity tumours and tumour-like lesions: a retrospective study of 486 cases (2015-2017). **Journal of Comparative Pathology**, v. 172, p. 80-87, 2019.

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, p. 323-332, 1997.

MUCHAAMBA, F. et al. A survey of feline leukaemia virus infection of domestic cats from selected areas in Harare, Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 85, p. 1-6, 2014.

NEIL, J. C. et al. Feline leukaemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 171, p. 67-93, 1991.

NESINA, S. et al. Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. **Retrovirology**, v. 12, p. 105, 2015.

NOVO, S. G. et al., Viral diagnostic criteria for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 4, p. 293-297, 2016.

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.

OGILVIE, G. K.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. F. Clinical and immunologic aspects of FeLV induced immunosuppression. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 287-296, 1988.

OLSON, S. W.; HOHENHAUS, A. E. Feline non-regenerative anemia: diagnostic and treatment recommendations. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, p. 615-631, 2019.

ORTEGA-PACHECO, A. et al. 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. et al. Prevalence and Genomic Diversity of Feline Leukemia Virus in Privately Owned and Shelter Cats in Aburrá Valley, Colombia. **Viruses**, v. 12, p. 464, 2020.

OVERBAUGH, J. et al. Structure and pathogenicity of individual variants within an immunodeficiency disease-inducing isolate of FeLV. **Virology**, v. 188, p. 558-569, 1992.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O.; HAY, D. Transmission of feline leukaemia virus in the milk of a non-viraemic cat. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 14, p. 381-384, 1986.

PAN, J. et al. In vivo expression of GFP transgene delivered via a replicating feline leukemia virus. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 181–195, 2005.

PATEL, M. et al. Comparative Efficacy of Feline Leukemia Virus (FeLV) Inactivated Whole-Virus Vaccine and Canarypox Virus-Vectored Vaccine during Virulent FeLV Challenge and Immunosuppression. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, p. 798-805, 2015.

PEDERSEN, N.; HO, E.; BROWN, M. et al. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, p. 790–793, 1987.

PEDERSEN, N. C. et al. Feline Leukemia Virus Infection as a Potentiating Cofactor for the Primary and Secondary Stages of Experimentally Induced Feline Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of virology**, v. 64, n. 2, p. 598-606, 1990.

PHIPPS, A. J.; HAYES, K. A.; AL-DUBAIB, M. et al. Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 40-7, 2000a.

PHIPPS, A. J. et al. Differential Pathogenicity of Two Feline Leukemia Virus Subgroup A Molecular Clones, pFRA and pF6A. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7048–7056, 2000b.

POFFO, D. et al. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukaemia virus (FeLV) and Leishmania sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 491-494, 2017.

POWERS, J. A. et al. Feline Leukemia Virus (FeLV) Disease Outcomes in a Domestic Cat Breeding Colony: Relationship to Endogenous FeLV and Other Chronic Viral Infections. **Journal of Virology**, v. 92, p. 1-16, 2018.

QUACKENBUSH, S. L. et al. Analysis of FeLV-FAIDS Provirus Burden and Productive Infection in Lymphocyte Subsets in Vivo. **Virology**, n. 223, p. 1–9, 1996.

QUIMBY, J. M. et al. Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 66-72, 2008.

RAVAZZOLO, A. M.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM; 2007. p. 829-30.

RAVI, M. et al. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and survival analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 271–276, 2010.

RAVICINI, S. et al. Prevalence of selected infectious disease agents in stray cats in Catalonia, Spain. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 2, p. 1-6, 2016.

REGGETI, F; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 1843–1852, 2004

REID, R. W.; BARR, M. C.; SCOTT, F. W. Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. **The Cornell Veterinarian**, v. 82, p. 359-369, 1992.

RIEMER, F. et al. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, p. 348-56, 2016.

REINACHER, M. Diseases Associated with Spontaneous Feline Leukemia Virus (FeLV) Infection in Cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 21, p. 85-95, 1989.

REIS, M. O.; MELLO, L. S.; HESSE, K. L. Osteochondroma in a young cat infected by feline leukemia virus. **Ciência Rural**, v. 47, e20151558, 2017.

RIEDEL, N. et al. Molecular Analysis and Pathogenesis of the Feline Aplastic Anemia Retrovirus, Feline Leukemia Virus C-SARMA. **Journal of virology**, v. 60, p. 242-250, 1986.

ROBB-SMITH, A.H.T. US National Cancer Institute working formulation of non-Hodgkin lymphomas for clinical use. **Lancet**, v. 320, p. 432-434, 1982.

ROCA, A. L. et al. Insertional Polymorphisms of Endogenous Feline Leukemia Viruses. **Journal of virology**, v.79, n. 7, p. 3979–3986, 2005.

ROCCABIANCA, P. et al. Cutaneous Lymphoma at Injection Sites: Pathological, Immunophenotypical, and Molecular Characterization in 17 Cats. **Veterinary Pathology**, v. 53, p. 823-832, 2016.

ROHN, J. L. et al. Evolution of Feline Leukemia Virus Variant Genomes with Insertions, Deletions, and Defective Envelope Genes in Infected Cats with Tumors. **Journal of virology**, v. 68, n. 4, p. 2458-2467, 1994.

ROJKO, J. L. et al. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 63, n. 3, p. 759-768, 1979.

ROLIN, V. M. et al. Clinical, pathological, immunohistochemical and molecular characterization of feline chronic gingivostomatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.19, p. 403-409, 2017.

SANTAGOSTINO, S.F. et al. Feline Upper Respiratory Tract Lymphoma: Site, Cytohistology, Phenotype, FeLV Expression, and Prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 52, p. 250-259, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARMA, P. S.; LOG, T. Viral interference in feline leukemia-sarcoma complex. **Virology**, v. 44, n. 2, p. 352-358, 1971.

SCHULMAN, F. Y. et al. Feline Peripheral Nerve Sheath Tumors: Histologic, Immunohistochemical, and Clinicopathologic Correlation (59 Tumors in 53 Cats). **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 1166–1180, 2009.

SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: GREENE, C. G. **Infectious disease of the dog and cat**. Missouri: Elsevier, 3 ed. p. 105-131, 2006.

SHELTON, G.H. et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia-virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats – a retrospective study (1968–1988). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**. v. 3, p. 623–630, 1990.

SHELTON, G.H. et al. Prospective hematologic and clinicopathologic study of asymptomatic cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 133-140, 1995.

SHALEV, Z et al. Identification of a feline leukemia virus variant that can use THTR1, FLVCR1, and FLVCR2 for infection. **Journal of Virology**, n. 13, v. 83, p. 6706–6716, 2009.

SHEETS R. L. et al. Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. **Journal of virology**. v. 67, n. 6, p. 3118-3125, 1993.

SCHERK, M. A. et al. 2013 AAFP feline vaccination advisory panel report. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 785-808, 2013.

SHIMODA, T. et al. A Hematological Study on Thirteen Cats with Myelodysplastic Syndrome. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 59-64, 2000.

SHINYA WATANABE et al. Phylogenetic and Structural Diversity in the Feline Leukemia Virus Env Gene. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, e61009, 2013.

SOBRINHO, R. S. V. et al. Sorofrequência de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina em gatos do município de Araçatuba, São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 378-383, 2011.

SOMA, T; ISHII, H. Detection of feline coronavirus antibody, feline immunodeficiency virus antibody, feline leukemia virus antigen in ascites from cats with effusive feline infection peritonitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 89-90, 2004.

SPADA, E. et al. Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and Toxoplasma gondii in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 369–377, 2012.

SPADA, E. et al. Survival time and effect of selected predictor variables on survival in owned pet cats seropositive for feline immunodeficiency and leukemia virus attending a referral clinic in northern Italy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 150, p. 38-46, 2018.

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

STEWART, M.A. et al. Sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. **Journal of Virology**, n. 58, p. 825–834, 1986.

STEWART, H. et al. Complete Genome Sequences of Two Feline Leukemia Virus Subgroup B Isolates with Novel Recombination Sites. **Genome Announcements**, v. 1, e00036-12, 2013.

STÜTZER, B. et al. Role of Latent Feline Leukemia Virus Infection in Nonregenerative Cytopenias of Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 192–197, 2010.

STÜTZER, B. et al. Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 81-87, 2011.

SUNTZ, M. et al. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 71–80, 2010.

SYKES, J. E. In: Feline Immunodeficiency Virus Infection. In: SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**, St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014, p. 214.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**, St. Louis, Missouri: Elsevier, p. 222-235, 2014.

TAMURA K; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.512-526, 1993.

TANDON, R. et al. Copy number polymorphism of endogenous feline leukemia virus-like sequences. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 257–266, 2007.

TASKER, S. et al. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 369-381, 2010.

TASKER, S. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n.20, p. 228–243, ,2018.

TASKER S. et al. Haemoplasmosis in Cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, p. 256–261, 2018.

TAYLOR, S. S. et al. Feline extranodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, p. 584–592, 2009.

TEIXEIRA, B. M. et al. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 939-942, 2007.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia veterinária**, São Paulo: Roca, 2ed., 2004, 556p.

THOMAS, D. F. et al. Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 111, p. 124-126, 2017.

TOMIYASU, H. et al. Clinical and clinicopathological characteristics of acute lymphoblastic leukaemia in six cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 59, p. 742-746, 2018.

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

TORRES, A. N.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Reexamination of feline leukemia virus: host relationships using realtime PCR. **Virology**, v.332, p.272–283, 2005.

TORRES, A. N. et al. Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 134, p. 122–131, 2010.

TROST, M. E. et al. Malignant histiocytosis in a cat – Case report. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 32-35, 2008.

TSATSANIS, C. et al. Genetic Determinants of Feline Leukemia Virus-Induced Lymphoid Tumors: Patterns of Proviral Insertion and Gene Rearrangement. **Journal of virology**, p. 8296-8303, 1994.

VALLI, V.E. et al. The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 295-306, 2000.

VALLI, V.E.; BIENZLE, D.; MEUTEN, D.J. Tumors of the hemolymphatic system. In: MAUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**, 5 ed., John Wiley & Sons, Ames, p. 203-321. 2017.

VALTOLINA, C.; FAVIER R. P. Feline hepatic lipidosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.47, p. 683-702, 2017.

VOGTT, A.H. et al. AAFP e AAHA feline life stage guidelines: background and goals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 46, p. 70-85, 2010.

YAMAMOTO, J. K. et al. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**. v. 49, n. 8, p. 1246-58, 1988.

YAMAMOTO, J. K. et al. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype felineimmunodeficiency-virus vaccine. **AIDS**, v. 21 p.547–563, 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, p. 69–70, 2000.

YUKARI ANAI et al. Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses. **Journal of Virology**, v. 86, p. 8634 – 8644, 2012.

WEISS, D. J. Aplastic anemia in cats -- clinicopathological features and associated disease conditions 1996-2004. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 203-206, 2006.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6th edn. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010, 1206p.

WESTMAN, M. E. et al. Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of care antigen test kits using blood and saliva. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 50, p. 88-96, 2017.

WESTMAN, M. E. et al. The Diagnosis of Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infection in Owned and Group-Housed Rescue Cats in Australia. **Viruses**, v. 11, n. 6, p.503, 2019.

WILLET, B. J. et al. Differential Utilization of CD134 as a Functional Receptor by Diverse Strains of Feline Immunodeficiency Virus. **Journal of virology**, v. 80, n.7, p. 3386-3394, 2006.

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

WITHOEFT, J. A. et al. 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.

APÊNDICE A — TERMO DE CONSENTIMENTO



LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do pesquisador principal: Renata Assis Casagrande

Titulo do projeto: Acompanhamento das alterações clínicas e hematológicas dos gatos positivos para os Vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) felina

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UDESC (CEUA/UDESC) nº 5806100918.

Objetivos do estudo: Caracterizar as alterações clínicas, hematológicas, evolução do quadro infeccioso e o tempo de sobrevida após diagnóstico de infecção por FeLV e FIV em gatos no Planalto Catarinense.

Procedimentos a serem realizados com os animais:

Os felinos que farão parte deste estudo serão acompanhados clinicamente, a partir do momento da consulta, por um período de 24 meses. A frequência do acompanhamento vai variar de acordo com cada grupo.

Grupo 1: esses serão acompanhados, por meio de exame clínico completo e exames laboratoriais de controle, com intervalos que podem variar de uma semana há três meses ou mais, dependendo da evolução do quadro clínico. Serão acompanhados semanalmente os felinos que apresentarem infecção progressiva em estágio avançado de evolução (anemia, leucemia, linfoma). Serão acompanhados trimestralmente os felinos que apresentarem infecção progressiva sem sinal clínico ou regressiva. O acompanhamento destes animais permitirá obter dados relacionados a evolução da doença e expectativa de vida a partir do momento do diagnóstico das enfermidades citadas a cima.

Grupo 2: o acompanhamento clínico consiste de avaliações semestrais, aonde o gato será submetido à exame clínico completo e realização de hemograma. Nesse período os felinos que desenvolverem alterações hematológicas, linfoma ou leucemia serão novamente testados para a infecção pelo FeLV e FIV (através do ELISA). O acompanhamento destes animais permitirá definir a taxa de infecção pelos vírus em relação ao fator de risco associado.

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 à presença de táratos, gengivite e estomatite), auscultação cardiopulmonar, temperatura corporal, exame ortopédico e neurológico completo.

Nos casos que for necessário realizar um novo teste para FeLV e FIV três gotas de sangue total será destinada a realização de um teste rápido através do método de

ELISA para a detecção do antígeno p27 (FeLV) e anticorpo contra p24 (FIV). Esse teste será realizado no ambulatório, logo após a coleta de sangue, através do kit SNAP FIV/FeLV Combo Test® (IDEXX Laboratories) de detecção simultânea para esses vírus.

No caso de óbito durante o período do acompanhamento clínico, com o consentimento dos tutores os felinos serão encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA-CAV/UDESC) para a realização da necropsia e diagnóstico histopatológico.

Potenciais riscos para os animais:

Por tratar-se do acompanhamento clínico de uma enfermidade já existente no felino, neste estudo nenhum dos procedimentos realizados acarretarão risco de vida ao paciente, além dos que os já impostos por sua condição clínica.

Cronograma:

Cronograma de Execução do Projeto:		
Ano	Mês	Descrição das fases
2018 a 2019	09/2018 a 12/ 2019	Acompanhamento clínico dos felinos
2018 a 2019	09/2018 a 12/ 2019	Coleta de sangue dos felinos
2018 a 2019	10/2018 a 12/ 2019	Realização dos exames de ELISA para FeLV e FIV dos felinos
2019	1, 2, 3, 4	Compilação dos resultados com determinação das alterações clínicas, hematológicas, evolução do quadro infeccioso e tempo de sobrevida após o diagnóstico de FeLV e FIV.
2019	5, 6, 7	Publicação dos resultados

Benefícios:

Com esse estudo será permitido caracterizar o quadro clínico e hematológico dessas enfermidades em gatos no Planalto Catarinense, contribuindo para a compreensão da patogênese da infecção por FeLV e FIV. Além disso, estreitando o vínculo entre o médico veterinário e os tutores, este estudo possibilitará a disseminação do conhecimento sobre os prejuízos que esses vírus podem causar a saúde dos felinos, atuando de maneira direta na conscientização para a prevenção dessas doenças.

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) 99944-2796 (WhatsApp - Giovana Biezas)

Equipe: Projeto FeLV e FIV

Nome: Renata Assis Casagrande

Endereço: Avenida Luiz de Camões, nº 2090, Conta Direiro, 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

Nome do Pesquisador / RG
Assinatura do Pesquisador

Identificação do(s) animal(is):

Nome: Número de/identificação:

Espécie: Raça:

APÊNDICE B — QUESTIONÁRIO



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AVULSAS E TÉCNICAS

**INFECÇÃO PELOS VÍRUS DA LEUCEMIA (FeLV)
E IMUNODEFICIÊNCIA FELINA (FIV) EM
FELINOS DOMÉSTICOS DO PLANALTO DE
SANTA CATARINA: PREVALÊNCIA E
IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE RISCO**

1. Identificação do paciente

1.1 Nº de identificação (ficha HCV): _____
1.2 Nome do paciente: _____

2. Identificação do tutor

2.1 Nome completo: _____
2.2 Endereço
Rua: _____

Bairro: _____

2.3 Telefone para contato: (____) - _____

2.4 O respondente é o proprietário?

Sim

Não

2.4.1 Caso não, qual a sua relação com o proprietário?

Família

Funcionário

Outro, especifique _____

3. Dados do paciente a serem respondidos pelo tutor

3.1 Idade: _____

3.2 Raça: _____

3.3 Sexo: Macho Fêmea

3.4 O felino é castrado?

Sim

Não

Não sei

3.4.1 Caso sim, com qual idade foi castrado?

3.5 O felino é vacinado?

Sim

Não

Não sei

3.5.1 Se sim responda as questões abaixo:

- Com que frequência é vacinado?

Todo o ano

A cada dois anos

Esporadicamente

- Qual a data da última vacinação (mês/ano)?

- A vacina utilizada apresenta proteção contra o FeLV?

Sim

Não

Não sei

3.6 Com qual frequência o felino é levado ao veterinário?

É a primeira vez

Mensalmente

A cada trimestre

A cada semestre

Todo o ano

Somente quando fica doente

3.7 Aonde o seu animal nasceu?

Nasceu em um criadouro, clínica veterinária, agropecuária.

Nasceu em outro domicílio.

Nasceu na mesma casa aonde vive.

Era um animal de rua.

F _____

3.8 Domiciliado em:

Apartamento

Casa

Pátio

Sítio

3.9 O felino possui acesso à rua?

Sim

Não

3.9.1 Outros felinos da rua ou de outras residências tem acesso a casa ou ao pátio onde ele reside?

Sim

Não

3.10 O felino reside com outros gatos?

Sim

Não

3.10.1 Se sim, responda as questões a baixo:

- Reside com quantos felinos? _____

- Os felinos compartilham caixas sanitárias e vasilhas de alimento?

Sim Não

3.102 Se não reside com outros gatos, apresenta contato através de visitas a domicílios com outros gatos, ou ficam hospedados em clínicas veterinárias ou outro estabelecimento?

Sim Não

3.11 Apresenta comportamento agressivo com outros felinos (brigar):

Sim

Não

4. Questões a serem respondidas pelo médico veterinário responsável pelo atendimento do caso clínico

4.1 Identificação do Médico Veterinário:

4.1.1 Nome: _____

4.2 Estado de saúde do paciente:

Saudável (Check up) (Castração)

Doente

4.2.1 Se doente, citar o diagnóstico presuntivo:

Os principais sinais clínicos encontrados

4.3 Escore corporal do felino:

Caquético

Magro

Normal

Sobre peso

Obeso

Observações:

Identificação Funcional

Data da aplicação: _____

APÊNDICE C — TABELA 18.

Tabela 18 — Estimativas de divergência evolutiva entre sequências de aminoácidos do gene *env* de FeLV-A e FeLV-B obtidos no estado de Santa Catarina, Brasil e sequências de *env* FeLV-A, FeLV-B e enFeLV obtidas no Genbank.

Variantes de FeLV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. ST-FeLV-B																						
2. US-FeLV-B	0,05																					
3. G92B-SC	0,17	0,12																				
4. GA-FeLV-B	0,19	0,14	0,20																			
5. G11B-SC	0,19	0,15	0,21	0,02																		
6. G60B-SC	0,19	0,15	0,21	0,02	0,01																	
7. G86B-SC	0,17	0,13	0,19	0,03	0,02	0,02																
8. 918B-MG	0,01	0,04	0,16	0,18	0,18	0,18	0,16															
9. G102B-SC	0,02	0,05	0,17	0,18	0,18	0,18	0,17	0,01														
10. 36TTenv-16	0,34	0,29	0,34	0,16	0,17	0,16	0,18	0,33	0,33													
11. Arena	0,35	0,30	0,37	0,17	0,17	0,17	0,18	0,34	0,34	0,05												
12. F18A-SC	0,35	0,31	0,37	0,18	0,17	0,16	0,18	0,34	0,34	0,06	0,04											
13. F21A-SC	0,37	0,33	0,38	0,20	0,19	0,19	0,20	0,36	0,36	0,08	0,06	0,02										
14. F66A-SC	0,37	0,33	0,39	0,19	0,18	0,18	0,19	0,36	0,36	0,08	0,06	0,03	0,05									
15. F175A-SC	0,36	0,32	0,38	0,19	0,18	0,17	0,19	0,35	0,35	0,07	0,05	0,02	0,03	0,04								
16. Glasgow-1	0,34	0,30	0,36	0,18	0,18	0,18	0,19	0,33	0,33	0,06	0,06	0,08	0,09	0,09	0,08							
17. G21A-SC	0,36	0,32	0,38	0,19	0,18	0,17	0,19	0,35	0,35	0,07	0,05	0,02	0,03	0,03	0,02	0,08						
18. 81TTenv-1	0,36	0,31	0,36	0,18	0,19	0,18	0,20	0,35	0,35	0,02	0,08	0,08	0,10	0,09	0,08	0,09	0,09					
19. G70A-SC	0,38	0,33	0,39	0,20	0,19	0,19	0,20	0,37	0,37	0,08	0,06	0,03	0,04	0,05	0,04	0,09	0,03	0,07				
20. A1-enFeLV	0,02	0,05	0,17	0,19	0,19	0,19	0,17	0,01	0,02	0,35	0,36	0,36	0,37	0,37	0,37	0,35	0,36	0,37	0,38			
21. A2-enFeLV	0,02	0,05	0,17	0,19	0,19	0,19	0,17	0,01	0,02	0,35	0,36	0,36	0,37	0,37	0,37	0,35	0,36	0,37	0,38	0,00		
22. FB29	0,66	0,64	0,66	0,62	0,61	0,61	0,61	0,65	0,65	0,60	0,61	0,61	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,63	0,66	0,66	0,66	

Fonte: Elaborada pela autora (2021).