MAGDA LILIANA GARCÍA LEAL

Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof[a]. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2115
FMVZ

García Leal, Magda Liliana
Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma / Magda Liliana García Leal. – São Paulo : M. L. García Leal, 2009.
87 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas.

1. Micoplasmas hemotrópicos. 2. Linfoma felino. 3. Anemia. 4. Vírus da leucemia felina. 5. Vírus da imunodeficiência felina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma", protocolado sob o nº1410/2008, utilizando 40 (quarenta) gatos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Evaluation of feline hemotropic mycoplasma infection in cats with lymphoma"protocol number 1410/2008, utilizing 40 (forty) cats, under the responsibility Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GARCÍA LEAL, Magda Liliana

Título: Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data:____/_____/_____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

Prof.Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

DEDICO

A **DEUS** por estar comigo cada dia e me permitir viver esta nova experiência.

A meus pais **Sonia** e **Guillermo** por me apoiar nesta nova etapa da minha vida e ser a base do que sou agora, particularmente a minha mãe já que "hija de tigre sale pintada", e as suas orações que todos sabemos o muito que serviram para a conclusão deste trabalho!!!!!

A **Lenin**, que com sua determinação e perseverança permitiu que eu esteja hoje culminando esta meta. Obrigada pelo amor, apoio e convívio nos últimos dias.

A Andrea "teitas" minha "hermanita" porque a oportunidade nos fez irmãs... mas os corações nos fizeram amigas!!!!

AGRADEÇO ESPECIALMENTE

À minha orientadora **Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas**, pelos ensinamentos, confiança, PACIÊNCIA e dedicação na correção do presente trabalho, agradeço por ter sido sempre tão acessível para a resolução de todas minhas dúvidas, e poder ter contado com o seu apoio até nas cosas pessoais, sua labor comigo foi muito além da orientação no nível acadêmico. Admiro-a como orientadora e como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, por me outorgar a bolsa de estudos que me permitiu aperfeiçoar meus conhecimentos em Clínica Veterinária na melhor instituição de ensino do País, a Universidade de São Paulo.

À **Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara** pela imensa colaboração para a realização deste trabalho, tendo disponibilizado todos os reagentes para a realização dos testes da PCR, pelas sugestões incorporadas ao projeto, e por me incentivar a desenvolver a visão critica sobre os acontecimentos. Sua capacidade de ensino é extraordinária. Meus mais sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**, pela co-orientação, solicitude e por ter disponibilizado o laboratório o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP, para a realização dos testes moleculares, por me incentivar nas horas difíceis e me acompanhar em todos meus sucessos e desventuras no decorrer da pesquisa, pela amizade e o apoio e por fazer crescer em mim a admiração e gosto pela Biologia Molecular, muito obrigada mesmo!!!.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson**, Coordenador da Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica Veterinária pelo apoio e colaboração em todos os assuntos referentes à minha bolsa, pela confiança para as traduções, pelas boas conversas a amizade e o carinho.

A todos os professores do Departamento de Clínica Médica de FMVZ-USP, pelo convívio agradável e os ensinos, particularmente à **Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, Profa. Dra. Maria Helena Larsson, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, Profa. Dra. Denise Saretta Schwartz, Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani e Prof. Dr.Fernando José Benesi.**

À **Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera** pelo carinho sempre expresso.

Aos **Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior, Profa. Maria Helena Larsson e Profa. Maria Claudia Sucupira**, por me permitirem tentar desenvolver com vocês minha capacidade didático-pedagógica. Espero ter correspondido ás suas expectativas e que em algum cantinho de vocês tenham ficado o gosto e o carinho pelo "Español" " Gracias!!!!".

Novamente agradeço ao **Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior** pela oportuna revisão do resumo em Inglês do presente trabalho.

À **M.V Msc. Aline Santana da Hora**, por ceder a amostra sanguínea que serviu como controle positivo para as reações da PCR, além da amizade e os bons conselhos.

Ao **doutorando Bruno Marques Teixeira**, pelo acompanhamento e realização das extrações de DNA das amostras, pelas longas conversas, pelos questionamentos críticos e especialmente pela amizade.

À **mestranda, Christiane Seraphim Prosser** por compartilhar comigo os gatos controle, por me "salvar" no momento crítico, pela amizade!

Às médicas veterinárias do Hospital Veterinário da FMVZ-USP **Vera A. B. Fortunato, Bruna Maria Pereira Coelho, Paula Rumy Monteiro, Denise Maria Nunes Simões, e Khadine K. Kanayama**, pela ajuda na triagem dos casos clínicos, o companheirismo e o aprendizado no dia a dia da clínica.

Aos funcionários enfermeiros do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, particularmente **Carlito dos Santos Belau e Milton Gregorio dos Santos** pela colaboração nas colheitas, e o carinho.

Às funcionarias dos diferentes laboratórios do Departamento de Clínica Médica Veterinária, **Maria Luíza Franchini, Maria Helena da Silva Pelissari, Marli Elisabete Ferreira de Castro, Clara S. Mori, Cláudia Regina Stricagnolo e Samantha Ive Myashiro**, pelo bom trabalho desempenhado nos seus respectivos laboratórios, pela paciência e boa vontade no ensino dos diferentes procedimentos laboratoriais, os bons conselhos e a amizade.

A **Creide Donizete Costa** pela oportuna liberação dos resultados hematológicos e bioquímicos

Aos meus colegas de pós-graduandos, amantes da Oncologia **Lucas Campos de Sá Rodrigues, Rodrigo Ubukata, Thais Rodrigues Macedo e Camila Ferreriro Pinto**, pela ajuda no acompanhamento dos casos, a amizade e o carinho.

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP **Sheila Oliveira** pela realização do seqüenciamento da amostra positiva.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP particularmente **Karen Asano** minha amiga "pé quente", **Sibele Pinheiro de Souza e Thaisa Sandri**, pela espontânea ajuda e os oportunos conselhos nos procedimentos das técnicas moleculares, o amável convívio do dia a dia, foi muito agradável trabalhar com vocês nesse ambiente de parceria. Muito obrigada minhas amigas!!

Ao **Prof. Fernando Ferreira** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, pela revisão da estatística do presente trabalho.

Ao pós-graduando **José H. H. Grisi Filho** pela paciência nas muitas horas de explicação que me permitiram fazer as provas estatísticas do presente trabalho.

À **Adelaide Borges** secretária da pós-graduação do Departamento de Clínica Médica Veterinária pela imensa colaboração e boa disposição para todo o que se referiu à minha estadia na pós-graduação, pela grande ajuda com a organização do meu Curriculum Lattes, pelas boas dicas até para coisas pessoais e pela amizade e os grandes favores. Muito obrigada mesmo!!!

Às secretárias do VCM **Maria Aparecida Freitas**, **Silvana R. Guedes** e **Ellen Binotto** pelas boa disposição e o carinho.

Ao pós-graduando **Alexander G. T. Daniel**, pelo trabalho em conjunto no P.A.E e a disposição para a consecução de um dos casos clínicos.

À estudante **Fernanda Fidelis**, pela amizade, a disposição e o bom humor que a caracteriza. Pela preocupação com os casos clínicos, obrigada!!

Ao pós-doutorando **Enio Mori**, pela largas conversas em questões moleculares, pela troca de conhecimentos e pela amizade.

Ao doutorando **Milton Ricardo Azedo** ("Tio Chico") pelos bons conselhos, as boas críticas e a amizade oferecida para esta sua nova "sobrina".

Ao **doutorando Lenin Arturo Villamizar Martinez** pela formatação do presente trabalho, a paciência e o carinho.

À Profa. **Dra. Carolina Brandão de Campos Fonseca Pinto** do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP por me permitir aprender um pouco da grande ciência que é o Diagnostico por Imagem, pelo apoio, e o carinho.

À **Profa. Silvia Renata Gaido Cortopassi** do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP pela afetuosa amizade.

À funcionária e **Medica Veterinária Silvana Maria Unruh** pelo profissionalismo e paciência para ensinar a todos os que alguma vez fomos estagiários.

À técnica do Serviço de Radiologia do HOVET da FMVZ-USP **Kátia Margareth Massonetto** pela amizade e os conselhos.

Às pós-graduandas **Cynthia Cristina Venâncio Silva, Samantha Ive Myashiro, Andréa Alves, Camila Dominguez de Oliveira, Valéria Marinho Costa de Oliveira**, pelo carinho, as tantas conversas, a risadas e os conselhos nas horas difíceis.

Á bibliotecária **Elza Maria Rosa B. Faquim** pela amável revisão da forma do presente trabalho e a boa disposição de sempre.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP pela grande ajuda para a consecução da informação, e particularmente a **Elena Aparecida Tanganini, Maria Fátima dos Santos, Solange Santana e Rosengela Rodriges Pereira**, pela amabilidade e o carinho com o qual desenvolvem o seu trabalho, e porque em vocês sempre encontre uma mão amiga e um grande sorriso. Muito obrigada por tudo!!!

A todos os funcionários da FMVZ que com o apoio e a amizade contribuíram para que minha estadia aqui fosse grata e encontrasse em você bons amigos.

Aos meus dois melhores amigos **Nubia Consuelo Martinez** e **Jorge Edwin Gelves** porque embora a distância seja considerável, a nossa amizade permanece forte e duradoura, pelo apoio e por estar sempre ali para mim!!!

ÂS minhas amigas de "aquelarre" **Cynthia P. Tello** e **Mariane Cassism**, pela amizade, os bons momentos, os despistes das duas, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos integrantes da colônia colombiana: **Martha Edith Velásquez, Alejandro Salazar, Fernando Erazo e Ariana Salazar Velasquez**, os quais me receberam, ajudando a me adaptar a esta nova cidade, e fazendo com que a saudade da minha família fosse menos evidente.

A meus tios **Eddie, Dora, Humberto** e **Vicky** pelo apoio, a força e o carinho, amo muito vocês!!!

¡ PIU AVANTI !

No te des por vencido, ni aun vencido,
No te sientas esclavo, ni aun esclavo;
Trémulo de pavor, piénsate bravo,
Y arremete feroz, ya mal herido.

Ten el tesón del clavo enmohecido,
Que ya viejo y ruin vuelve a ser clavo;
No la cobarde intrepidez del pavo
Que amaina su plumaje al primer ruido.

Procede como Dios que nunca llora,
O como Lucifer, que nunca reza,
O como el robledal, cuya grandeza
Necesita del agua y no la implora ...

¡Que muerda y vocifere vengadora,
Ya rodando en el polvo tu cabeza!

ALMAFUERTE

RESUMO

GARCÍA LEAL, M. A. **Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma**. [Evaluation of feline hemotropic mycoplasma infection in cats with lymphoma]. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Com o objetivo de avaliar a freqüência de infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma e seu impacto na ocorrência de anemias nesses animais, foram analisadas amostras sangüíneas de 14 animais com diagnóstico de linfoma, sem qualquer tratamento prévio e 14 amostras de sangue de gatos hígidos, por meio da técnica de PCR-Nested. Utilizaram-se primers que amplificam fragmentos do gene 16S rRNA dos micoplasmas. Eritrograma e bioquímica sérica foram realizados, assim como testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA) para ambos os retrovírus. Anemia foi observada em 28,6% (4/14) dos gatos com linfoma. Em dois a anemia foi classificada como normocítica normocrômica não regenerativa, e em outros dois como macrocitica normocrômica não regenerativa. A freqüência de infecção pelos micoplasmas hemotrópicos felinos nos gatos com linfoma foi de 7,14% (1/14). Após seqüenciamento e posterior prova de identidade no GenBank, o agente foi identificado como *M. haemofelis*, número de acesso FJ544859. A freqüência de infecção pelos retrovírus foi de 21,42% para o FeLV e 7,14% (3/14) para o FIV. O animal infectado pelo *M. haemofelis* não apresentou anemia, ainda que apresentasse infecção concomitante pelo FeLV. O grupo controle não apresentou infecção por micoplasmas ou retrovírus. Nas condições em que este estudo foi realizado, concluiu-se que a anemia observada nos gatos com linfoma não foi ocasionada pela infecção por micoplasmas hemotrópicos, mas provavelmente em decorrência das alterações hematológicas promovidas pelo processo neoplásico, associadas ou não à infecção pelo FeLV. Portanto, a infecção pelos micoplasmas não apresentou um impacto direto na ocorrência de anemias em gatos com linfoma.

Palavras-chave: Micoplasmas hemotrópicos. Linfoma felino. Anemia. Vírus da leucemia felina. Vírus da imunodeficiência felina.

ABSTRACT

GARCÍA LEAL, M. A. **Evaluation of feline hemotropic mycoplasma infection in cats with lymphoma**. [Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma]. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

To evaluate the frequency of infection by hemotropic mycoplasmas in cats with lymphoma and its impact in the development of anaemia in those animals, blood samples from 14 animals diagnosed with Lymphoma and without any previous treatment and 14 blood samples from healthy cats were analyzed by means of the PCR-Nested technique. Primers were utilized and selectively amplified fragments of 16SrRNA gene of mycoplasma. Haematology, serum biochemical profile and FeLV/FIV ELISA were performed in all 28 cats. Anaemia was observed in 28.6% (4/14) of the cats with lymphoma. In two of them, anaemia was classified as normocytic-normochromic nonregenerative and in the other two as macrocytic-normochromic nonregenerative. The frequency of feline haemotropic mycoplasmas infection in cats with lymphoma was 7.14% (1/14). After sequencing and identity proof by the GenBank, the agent was identified as *M. haemofelis*, access number FJ544859. The frequency of retrovirus infection among all the cats with lymphoma was 21.42% (3/14) for FeLV and 7.14% (1/14) for FIV. The cat infected by *M. haemofelis* was also infected with FeLV, but was not anaemic. The 14 cats used as control did not exhibited infection by mycoplasmas or retrovirus infections. Under the conditions in which this study was developed, one can conclude that the anaemia observed in cats with lymphoma may not be related to hemotropic microplasmas infection, but to haematologyc alterations promoted by the associated neoplasic process and/or the occurrence or of FeLV infection. Therefore, the infection by the mycoplasmas did not present a direct impact in the occurrence of anaemies in cats with limphoma.

Keywords: Haemotropic micoplasmas. Feline Lymphoma. Anaemia. Feline Leukemia Virus. Feline Immunodeficiency Virus.

RESUMEN

GARCÍA LEAL, M. A. **Evaluación de la frecuencia de infección por micoplasmas hemotrópicos felinos en gatos con linfoma**. [Avaliação da freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma]. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Con el objetivo de evaluar la frecuencia de infección por micoplasmas hemotrópicos en gatos con linfoma y su impacto en la ocurrencia de anemias en eses animales, fueron analizadas muestras sanguíneas de 14 animales con diagnostico de linfoma, sin cualquier tratamiento previo y 14 muestras de sangre de gatos saludables, por medio de la técnica de PCR-Nested. Se utilizaron *primers* que amplifican fragmentos del gen 16S rRNA de los micoplasmas. Fueron realizados hemograma y bioquímica sérica, así como pruebas serológicas inmunoenzimaticas (ELISA) para detección de los retrovirus. La anemia fue observada en 28,6% (4/14) de los gatos con linfoma. En dos de ellos, la anemia fue clasificada como normocítica normocrómica no regenerativa y en los otros dos como macrocitica normocrómica no regenerativa. La frecuencia de infección por los micoplasmas hemotrópicos felinos en los gatos con linfoma fue de 7,14% (1/14). Después del secuenciamiento de la muestra positiva y prueba de su identidad en el GenBank, el agente fue identificado como *M. haemofelis*, con el número de acceso FJ544859. La frecuencia de infección por los retrovirus fue de 21,42% (3/14) para FeLV y 7,14% (1/14) para FIV. El animal infectado por el *M. haemofelis* no manifestó anemia, aún presentando infección concomitante por el FeLV. El grupo de animales control no presentó infección por los micoplasmas o los retrovirus. En las condiciones en que este estudio fue desarrollado, se concluye que la anemia observada en los gatos con linfoma no fue relacionada a la infección por los micoplasma hemotrópicos, más bien, fue debida a las alteraciones hematológicas promovidas por el proceso neoplásico o a la asociación o no con la infección por el FeLV. Por lo tanto, la infección por los micoplasmas no presentó un impacto directo en la ocurrencia de anemias en gatos con linfoma.

Palabras clave: Micoplasmas hemotrópicos. Linfoma Felino. Anemia. Virus de la leucemia felina. Virus de la inmunodeficiencia felina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Kit* para extração de DNA de amostras sangüíneas (Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit da GE Healthcare) 48

Figura 2 - (A) Montagem das amostras de sangue nos tubos e (B) aplicação da Proteinase K em cada *eppendorf* previamente identificado 49

Figura 3 - (A) Montagem das colunas de extração nos tubos coletores. (B) Forma de "carregar" os tubos coletores com o produto da lise das hemácias 49

Figura 4 - (A) Transferência das colunas de purificação a novos tubos *eppendorf*. (B) Obtenção do filtrado de DNA para estocagem 50

Figura 5 - Diagrama de blocos da contagem global de eritrócitos nos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,012) - São Paulo - 2009 60

Figura 6 - Diagrama de blocos dos valores do volume globular dos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,012) - São Paulo - 2009 61

Figura 7 - Diagrama de blocos dos valores da hemoglobina dos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,004) - São Paulo - 2009 61

Figura 8 - Produtos da amplificaçao identificados pela fluorescência do brometo de etidio em gel de agarose 1,5%, onde 1 é o marcador de peso molecular (100pb), 2 e 3 amostras negativas, 4 amostra positiva, 5 controle negativo da PCR-Nested, 6 amostra negativa, 7 controle negativo da PCR, 8 controle positivo da PCR e 9 segundo controle negativo da PCR- Nested – São Paulo – 2009 62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - *Primers* utilizados para a amplificação do 16S RNA. 51

Quadro 2 - Componentes do *Mix* para a PCR..... 52

Quadro 3 - Componentes do *Mix* para a PCR-Nested 52

Quadro 4 - Componentes do *Mix* para a reação do *primer* senso de seqüenciamento 54

Quadro 5 - Componentes do *Mix* para a reação do *primer* antisenso de seqüenciamento..... 54

Quadro 6 - Condições térmicas para a PCR de seqüenciamento. Temp: temperatura, min: minutos, seg: segundos 55

Quadro 7 - Identificação, classificação do linfoma, positividade na pesquisa de *Mycoplasma* spp, e teste sorológico para os retrovírus FeLV e FIV, nos felinos com linfoma – São Paulo – 2009..... 58

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores de média, desvio padrão, mediana, primeiro e terceiro quartis, nível de significância (*p*) e de referencia das variáveis do eritrograma dos animais com linfoma e do grupo controle – São Paulo – 2009 59

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNORS	proteínas argirofilicas relacionadas a regiões organizadoras do nucléolo
ALT	alanina aminotransferase
ALP	fosfatase alcalina
AST	aspartato aminotransferase
bp	pares de bases
C.H.C.M	concentração de hemoglobina corpuscular média
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	(*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sangüíneo
FeLV	vírus da leucemia felina
FIV	vírus da imunodeficiência felina
fL	fentolitros
g	gramas
g	unidade de medida da força centrífuga relativa
GGT	gamaglutamil transferase
H.C.M	hemoglobina corpuscular média
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HOVET	Hospital Veterinário
kb	kilobase
Ki-67	anticorpo monoclonal que funciona como marcador de proliferação celular
L	litro
M	molar

M.	*Mycoplasma*
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/kg	miligrama por kilograma
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
min	minutos
mL	mililitro
mm^3	milímetro cúbico
mM	milimolar
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
n	número de animais
ng	nanogramas
p	valor crítico amostral
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR-Nested	reação em cadeia da polimerase que amplifica uma seqüência interna de um fragmento previamente amplificado
pg	picogrmas
primers	oligonucleotídeos
q.s.p	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
seg	segundos
SPN	síndrome paraneoplásica
spp	espécies
Temp	temperatura
U	unidades
V.C.M	volume corpuscular médio
x	vezes

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Valores relativos aos hemogramas dos felinos com linfoma no momento do diagnóstico - São Paulo - 2009 81

APÊNDICE B - Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo - 2009 82

APÊNDICE C - Determinações relativas à avaliação renal e hepática dos felinos com linfoma no momento do diagnóstico - São Paulo - 2009 83

APÊNDICE D - Determinações relativas à avaliação renal e hepática dos felinos do grupo controle - São Paulo - 2009 84

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Seqüência de nucleotídeos referente à amostra positiva para o *M. haemofelis* utilizada como controle positivo para as reações da PCR e disponível no GenBank 85

ANEXO B - Seqüência de nucleotídeos referente à amostra positiva para o *M. haemofelis* obtida em um gato com linfoma mediante as reações da PCR e disponível no GenBank 86

ANEXO C - Exemplo de algumas das seqüências do *M. haemofelis* depositadas no GenBank, com as quais a seqüências obtida no presente estudo teve uma identidade de 99% 87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26

2 REVISÃO DE LITERATURA 30

3 MATERIAL E MÉTODO 44

3.1 GRUPO EXPERIMENTAL 44

3.2 GRUPO CONTROLE 44

3.3 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS 45

3.4 EXAMES COMPLEMENTARES 45

3.4.1 Exame citológico 45

3.4.2 Exame histopatológico para diagnóstico de linfoma 46

3.4.3 Hemograma 46

3.4.4 Análises bioquímicas 46

3.4.5 Avaliação da infecção pelos retrovírus 47

3.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR 47

3.5.1 Extração do DNA 48

3.5.2 Controles positivo e negativo para a reação da PCR 51

3.5.3 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase 51

3.5.4 Analise do produto amplificado 53

3.5.5 Purificação do DNA 53

3.5.6 Seqüenciamento do DNA 54

3.5.7 Precipitação do DNA 55

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56

4 RESULTADOS 57

5 DISCUSSÃO 64

6 CONCLUSÕES 71

REFERÊNCIAS 72

APÊNDICES 81

ANEXOS 85

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas, neoplasias com origem nas células linfóides, são as neoplasias mais comumente observadas nos gatos domésticos (VAIL, 2007), além de existirem evidências também de sua ocorrência em felídeos selvagens (MARKER et al., 2003).

Vários fatores podem estar envolvidos na etiologia dos linfomas, entre eles fatores virais, genéticos, ambientais, imunológicos, inflamatórios e provavelmente também efeito de componentes da dieta (VAIL, 2007). Quanto aos fatores virais, a infecção pelo FeLV em gatos domésticos está associada com a ocorrência de doenças linfo e mieloproliferativas incluindo linfomas e leucemias linfóide, mielóide ou eritróide, e também com doenças degenerativas, que podem se manifestar pela presença de anemia (LEVY, 2008). A infecção pelo FIV também tem sido associada a linfomas, leucemias e outros tipos de tumores (SELLON; HARTMAN, 2006).

A classificação do linfoma nos gatos não é bem estabelecida. Em decorrencia da grande variabilidade de apresentação nos felinos e pela combinação de varios tipos de tecidos acometidos, alguns autores criaram sua própria classificação (GABOR; MALIK; CANFIELD, 1998). A classificação de uso mais corrente é feita com base na localização anatômica e na morfologia celular. Assim, em termos gerais, segundo a localização anatômica pode se falar de quatro tipos de linfoma: alimentar, mediastinal, nodal e extranodal (VAIL, 2007).

Com relação ao tratamento, a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia são as três principais modalidades terapêuticas disponíveis para o manejo do linfoma felino, e podem ser utilizadas como tratamento isolado ou combinadas entre si (HAYES, 2006a). Em geral, os gatos toleram bem a quimioterapia, mas alguns efeitos secundários podem ocorrer como anorexia, toxicidade renal, alopecia, mielossupressão e síndrome de lise aguda do tumor. Assim, exames hematológicos e bioquímicos devem ser realizados periodicamente, com o intuito de evidenciar alterações sejam elas decorrentes da neoplasia ou dos efeitos do tratamento antineoplásico (HAYES, 2006a).

Em humanos, as disfunções hematológicas ocorrem comumente em pacientes com neoplasias malignas. Mais da metade dos pacientes são anêmicos devido às perdas sanguíneas agudas ou crônicas, comprometimento da medula óssea em decorrência de infiltração tumoral, mielossupressão secundária à quimioterapia ou pela anemia da doença crônica e, com menos freqüência, a anemia pode ser o resultado da aplasia da medula, esplenomegalia ou processos hemolíticos (JOHNSON; ROODMAN, 1989).

No caso dos felinos, as anemias hemolíticas podem ser causadas por agentes infecciosos (ex. micoplasmas) ou reações imunomediadas contra os eritrócitos (KOHN et al., 2006). Nos gatos com linfoma, as alterações imunológicas decorrentes do linfoma e a imunossupressão decorrente do uso de agentes antineoplásicos podem ser indistinguíveis e ambas podem resultar em um risco importante para a ocorrência ou reativação de infecções latentes (DOBSON, 1998), como é o caso da infecção por micoplasmas.

Os recentemente denominados micoplasmas hemotrópicos felinos correspondem aos parasitos outrora classificados como *Haemobartonella felis,* identificados como agentes causadores da anemia infecciosa felina. Até recentemente, esses parasitos eram classificados como rickéttsias, com base em seu pequeno tamanho, coloração Gram negativa, parasitismo de eritrócitos e a possível evidência de transmissão por artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2007a). Não obstante, a caracterização molecular baseada no seqüenciamento do gene 16S RNA ribossômico, das espécies *Haemobartonella* e *Eperythrozoon,* revelou sua proximidade com os membros da classe *Mollicutes* (SYKES, 2003; WILLI et al., 2007a). Assim, com base nas características fenotípicas tais como o pequeno tamanho do microrganismo e o genoma, a ausência da parede celular e o flagelo, resistência à penicilina e suscetibilidade às tetraciclinas, os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma,* como micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001).

A micoplasmose hemotrópica felina pode ocorrer em animais de qualquer idade (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990; SYKES, 2003; TASKER et al., 2003a; BAUER et al., 2008). Os machos parecem ser mais acometidos que as fêmeas, em decorrência dos hábitos de deambulação e o possível envolvimento em

brigas (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990; WILLI et al., 2006a). A infecção pelos retrovírus FIV e FeLV tem sido associada por alguns autores, com o incremento no risco de infecção pelos micoplasmas (VANSTEENHOUSE; TABOADA; MILLARD, 1993; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002; MACIEIRA et al., 2007BAUER et al., 2008). A inter-relação da infecção pelos micoplasmas e o FeLV pode estar associada a uma supressão da resposta imune causada pelo vírus, o que aumentaria a suscetibilidade do animal aos micoplasmas, ou levaria à reativação de uma infecção latente (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990). Embora seja reconhecida a associação dos hemoplasmas com estados imunossupressivos ou doenças concomitantes, sabe-se que alguns gatos infectados não apresentam um fator predisponente, e nesses casos, o micoplasma (particularmente *M. haemofelis*) pode ser considerado o patógeno primário (TASKER, 2006a).

Os sintomas da doença são inespecíficos e muitas vezes conseqüentes ao quadro de anemia (SYKES, 2003). Acredita-se que a presença dos microrganismos nos eritrócitos circulantes estimule uma forte atuação do sistema mononuclear fagocitário, principalmente o baço, onde são seqüestrados os eritrócitos que se encontram parasitados (SYKES, 2003). Dessa forma, a anemia ocorre primariamente como resultado da destruição extravascular dos eritrócitos, por meio dos macrófagos no baço, fígado, pulmões e medula óssea. Além disso, associada às alterações diretas promovidas pelos parasitos, a exposição de epitopos da membrana eritrocitária, normalmente não expostos, pode ocasionar a formação de anticorpos antieritrocitários. Assim, a resposta imune torna-se extremamente importante no desenvolvimento da doença (HARVEY, 2006).

Para o diagnóstico, o único método anteriormente disponível era a demonstração do microrganismo na superfície dos eritrócitos, no exame microscópico dos esfregaços sanguíneos, com a utilização de métodos de coloração como Giemsa, Wrigth, laranja de acridina, entre outros. Como procedimento diagnóstico, a análise do esfregaço sanguíneo apresenta várias desvantagens como a confusão na identificação dos parasitos com artefatos de técnica produzidos pela coloração, corpúsculos de Howell-Jolly e as perdas dos parasitos após exposição

prolongada dos eritrócitos ao EDTA, utilizado nas colheitas de sangue (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

Apenas com o advento das técnicas moleculares, abriu-se a possibilidade do diagnóstico definitivo da infecção pelos micoplasmas hemotrópicos, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes de PCR baseiam-se na identificação do gene RNA16S ribossômico, a partir da extração do DNA, com vários e diferentes pares de *primers* (senso e anti-senso) já descritos.

Assim, considerando a importância do estudo dos linfomas em gatos e a possibilidade da infecção por micoplasmas hemotrópicos nesses animais, o que poderia representar complicações tanto na evolução da doença neoplásica, com maior freqüência de quadros de anemia, que sabidamente diminuem a sobrevida dos animais e retardam o inicio do tratamento, quanto na terapia antineoplásica, que pode levar a imunossupressão e reativação de infecções latentes, foram objetivos deste estudo avaliar a freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma e seu impacto na ocorrência de anemias nesses animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os linfomas, neoplasias com origem nas células linfóides, são as neoplasias mais comumente observadas nos gatos domésticos (VAIL, 2007), além de existirem evidências também de sua ocorrência em felídeos selvagens (MARKER et al., 2003).

Geralmente, a neoplasia manifesta-se pelo comprometimento de tecidos linfóides tais como linfonodos, baço e medula óssea (VAIL, 2007), porém, pode apresentar-se em qualquer tecido, incluindo locais pouco comuns, como a bula timpânica (LORIMIER; ALEXANDER; FAN, 2003), os tecidos intracranianos (TROXEL et al., 2003), os nervos periféricos (HIGGINS et al., 2008) ou mesmo na medula espinhal (MARIONI-HENRY et al., 2008).

Vários fatores podem estar envolvidos na etiologia dos linfomas, entre eles fatores virais, genéticos, ambientais, imunológicos, inflamatórios e provavelmente também efeito de componentes da dieta (VAIL, 2007). Quanto aos fatores virais, a infecção pelo FeLV em gatos domésticos está associada com a ocorrência de doenças linfo e mieloproliferativas incluindo linfomas e leucemias linfóide, mielóide ou eritróide, e também com doenças degenerativas, que podem se manifestar pela presença de anemia (LEVY, 2008).

O FeLV foi a maior causa de ocorrência de neoplasias hematopoiéticas nos gatos na chamada “era FeLV”, entre os anos de 1960 a 1980, período no qual, nos Estados Unidos, 60% a 70% dos linfomas eram associados ao FeLV (VAIL et al., 1998; VAIL, 2007). No período posterior, a partir de 1985, devido à introdução da vacina contra a leucemia felina e o desenvolvimento de testes efetivos para a detecção do retrovírus, houve uma redução significativa na incidência de linfoma em gatos jovens, que em geral eram FeLV-positivos, e um aumento da doença em gatos velhos FeLV-negativos (TWOMEY; ALLEMAN, 2005).

O mecanismo pelo qual o FeLV causa neoplasias pode ser explicado pela inserção de seu genoma no genoma celular do hospedeiro, próximo a um oncogene (mais comumente *myc*), resultando na ativação e superexpressão desse oncogene (TSATSANIS et al., 1994). Este efeito leva a um descontrole na proliferação desta

célula (clone). Além disso, o FeLV tipo A pode incorporar o oncogene para formar um vírus recombinante (p.ex. FeLV-B e FeSV), passando a apresentar seqüências celulares de oncogenes que são então rearranjadas e ativadas e, quando penetram na célula do hospedeiro, esses vírus são oncogênicos (HARTMANN, 2006). As neoplasias também são resultado da ausência de uma resposta imune adequada para promover a destruição das células transformadas. Assim, os gatos FeLV positivos podem ter 62,1 vezes mais chances de desenvolver linfoma que os gatos FeLV negativos (SHELTON et al., 1990). No Brasil, em um estudo com 410 felinos foi encontrada uma prevalência de 8% de infecção pelo FeLV, sendo que 20% desses animais apresentavam linfoma (RECHE; HAGIWARA; LUCAS, 1997). Entretanto, o FeLV também pode estar associado com o desenvolvimento de linfoma em gatos sorologicamente negativos. O DNA proviral tem sido detectado no genoma celular de gatos FeLV-negativos com linfoma, portanto, uma infecção debelada inicialmente pelo organismo, pode ainda causar transformação maligna em células linfóides, sem resultados positivos ao teste sorológico que detecta a proteína p27 do FeLV (TWOMEY; ALLEMAN, 2005).

Considerando ainda os fatores virais, a infecção pelo FIV também tem sido associada a linfomas, leucemias e outros tipos de tumores, entretanto, o provírus FIV é apenas ocasionalmente detectado em células tumorais, sugerindo um papel indireto na ocorrência do linfoma, tal como redução na imunidade mediada por células ou hiperplasia crônica de células B (SELLON; HARTMANN, 2006). Os gatos infectados pelo FIV têm 5,6 vezes mais chance de desenvolver o linfoma que aqueles FIV negativos (SHELTON et al., 1990).

Quanto aos fatores genéticos, em estudos desenvolvidos na Austrália, a ocorrência de linfoma foi maior em gatos siameses, orientais e seus cruzamentos (COURT; WATSON; PEASTON, 1997; GABOR; MALIK; CANFIELD, 1998). Além de ser a raça mais prevalente, os siameses apresentaram uma suscetibilidade maior à infecção pelo FeLV, o que levou os pesquisadores a inferir que exista também uma suscetibilidade genética para a ocorrência de linfomas, ou ainda, algum fator comum na forma de criação e manutenção desses animais nos criatórios (GABOR; MALIK; CANFIELD, 1998; GABOR et al., 2001).

Em relação ás causas ambientais, descreveu-se que gatos jovens, com exposição à fumaça de cigarro (fumantes passivos), apresentaram um risco relativo de desenvolvimento do linfoma 2,4 superior aos animais sem contato com fumantes, enquanto o risco relativo em gatos com 5 anos ou mais foi 3,2 maior (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2002).

Considerando o envolvimento dos processos inflamatórios no desencadeamento das neoplasias, em humanos tem se demonstrado uma forte associação entre a infecção por *Helicobacter pylori* e o desenvolvimento de inflamação crônica e câncer gástrico. Da mesma forma, relata-se uma associação entre o *H. heilmannii* e o desenvolvimento de gastrite e linfoma nos gatos (BRIDGEFORD et al., 2008). Além disso, os sarcomas de aplicação nos felinos estão diretamente relacionados com inflamação local, assim, acredita-se que os fatores que favorecem o desenvolvimento dos sarcomas de aplicação nos gatos podem ser similares àqueles que incrementam o risco de ocorrência de linfomas (MADEWELL et al., 2004).

A classificação do linfoma nos gatos não é bem estabelecida. Em decorrencia da grande variabilidade de apresentação nos felinos e pela combinação de varios tipos de tecidos acometidos, alguns autores criaram sua própria classificação (GABOR; MALIK; CANFIELD, 1998). A classificação de uso mais corrente é feita com base na localização anatômica e na morfologia celular. Assim, em termos gerais, segundo a localização anatômica pode se falar de quatro tipos de linfoma: alimentar, mediastinal, nodal e extranodal (VAIL, 2007). Além disso, a Organização Mundial da Saúde também inclui uma subdivisão em estágios, segundo a severidade (algarismos romanos I a V) e a apresentação (b) ou não de sintomas clínicos (a) (VAIL; YOUNG, 2007).

A forma alimentar é a mais comumente encontrada nos gatos, juntamente com a forma mediastinal, seguidas em ordem decrescente pelas formas nodal e extranodal (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). Achados similares foram descritos no Brasil, em um trabalho de casuística hospitalar, no qual a prevalência da forma alimentar representou 32,3%, seguida da forma mediastinal (29,4%), nodal (20,7%) e extranodal (17,6%) (MELLO et al., 2007). O linfoma alimentar pode comprometer apenas o intestino, como uma infiltração difusa de células neoplásicas, ou

apresentar uma combinação de envolvimento dos linfonodos intestinais e mesentéricos (VAIL, 2007). De igual modo, pode se apresentar também na cavidade oral, esôfago, estômago, pâncreas, alem do fígado (HAYES, 2006b) O local mais freqüentemente acometido pela infiltração neoplásica é o intestino delgado (50% a 80% dos casos), seguido pelo estômago (aproximadamente 25%), junção ileocólica e ceco. O linfoma pode infiltrar-se de forma difusa nas camadas muscular e submucosa dos intestinos, ou ainda apresentar um crescimento localizado, resultando num espessamento concêntrico em direção á luz intestinal, que leva à obstrução parcial ou completa do órgão (VAIL, 2007).

A forma mediastinal pode envolver o timo, os linfonodos mediatinais e esternais (VAIL, 2007) e hílares (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). Essa forma anatômica está freqüentemente associada com acúmulo de fluido no espaço pleural, sendo que o derrame pode apresentar características de pseudoquilo ou mesmo hemorrágico, comumente contendo células neoplásicas (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). Ocasionalmente o tumor se estende além da entrada do tórax, podendo ser palpável na região cervical ventral (VAIL, 2007). A dispnéia que geralmente acompanha esses casos deve-se á compressão dorsal dos pulmões, que raramente são infiltrados por células neoplásicas (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002).

A forma nodal, com envolvimento exclusivo dos linfonodos periféricos, é pouco freqüente nos gatos com linfoma, representando aproximadamente 4% a 10% dos casos (VAIL et al., 1998). Segundo Hayes (2006b), o termo “multicêntrico” tem sido usado para esta forma de apresentação nos felinos, mas não é sinônimo estrito de linfonodomegalia generalizada. Embora os gatos sejam freqüentemente descritos como apresentando linfoma multicêntrico, com múltiplos órgãos envolvidos (fígado, baço, linfonodos abdominais), isso raramente inclui linfonodomegalia generalizada, como é freqüentemente observado nos cães. Na última década, foi descrita uma forma incomum e distinta dos linfomas nodais em gatos, referidos como linfomas *Hodgkin´s-like;* os quais envolvem linfonodos únicos ou regionais da cabeça e o pescoço, e que histologicamente assemelha-se ao linfoma do tipo Hodgkin dos seres humanos (GABOR; MALIK; CANFIELD, 1998).

Quanto os linfomas extranodais, podem acometer os rins, sistema nervoso central, pele, cavidade nasal, olhos e espaço retrobulbar (VAIL, 2007). O linfoma é considerado a neoplasia renal mais comum nos felinos (HAYES, 2006b), pode ser de origem primária ou estar associado com o linfoma alimentar (VAIL, 2007). Embora acometa aparentemente um único rim (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002), a doenca deve ser considerada bilateral em todos os casos (HAYES, 2006b). Os linfomas da medula espinhal e intracranianos podem ocorrer em gatos idosos FeLV-negativos, sendo o segundo tipo de tumor mais freqüente no sistema nervoso central (TROXEL et al., 2003). Os linfomas cutâneos geralmente são primários, mas podem ser vistos secundariamente ao envolvimento multicêntrico. São mais observados em gatos idosos e podem apresentar as formas epiteliotrópica (linfócitos T) e não epiteliotrópica (linfócitos B) (VAIL, 2007). O linfoma nasal é usualmente uma doença localizada, mas a extensão sistêmica ocasionalmente pode ocorrer (LITTLE; PATEL; GOLDSCHMIDT, 2007). O linfoma ocular pode ser unilateral ou bilateral e pode preceder a doença sistêmica em alguns gatos (HAYES, 2006b).

Quanto ao diagnóstico do linfoma, o exame citológico após punção aspirativa com agulha fina dos tecidos afetados, é um método relativamente não invasivo e de alta efetividade, embora nos gatos, quando comparados aos cães, ofereça um maior desafio diagnóstico, considerando as localizações mais freqüentes do tumor e a morfologia celular. Por isso, muitas vezes o exame histológico é necessário para o diagnóstico definitivo (TWOMEY; ALLEMAN, 2005). Além disso, as amostras de material obtido por punção aspirativa ou biopsia podem também ser analisadas por várias técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas, para determinar a imunofenotipagem (linfócitos B, T ou não B não T), índices de proliferação (Ki-67, AgNORs), atividade da telomerase e subtipo histológico (de baixo, meio ou alto grau de malignidade) (VAIL, 2007).

Nos gatos diagnosticados com linfoma, a avaliação geral deve incluir no mínimo, hemograma, contagem de plaquetas e perfil bioquímico sérico, além dos testes sorológicos para ambos os retrovírus, ultra-sonografia abdominal e radiografias de tórax, (VAIL, 2007).

O tratamento do linfoma nos gatos tem resultados menos previsíveis que para os cães, em decorrência da grande variabilidade histológica e as diferentes formas

anatômicas observadas nos felinos (HAYES, 2006a; VAIL, 2007). A quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia são as três principais modalidades terapêuticas disponíveis para o manejo do linfoma felino, e podem ser utilizadas como tratamento isolado ou combinadas entre si (HAYES, 2006a).

Vários fármacos com diferentes mecanismos de ação são reconhecidos por suas propriedades antineoplásicas como, por exemplo: os agentes alquilantes que interferem com a replicação do DNA; os antimetabólitos que interferem com a síntese do DNA ou RNA, por inibição enzimática ou causando síntese de moléculas não funcionais, os alcalóides da vinca, que são antimitóticos e outros (DOBSON, 1998).

Os protocolos quimioterápicos antineoplásicos combinados, que incluem L-asparaginase, doxorrubicina, ciclofosfamida, vincristina e prednisona são efetivos em cães e têm sido utilizados também em felinos (HADDEN et al., 2008). Fatores como toxicidade, exeqüibilidade na administração e o custo, devem ser considerados na escolha do protocolo terapêutico (HAYES, 2006a). Em geral, os gatos toleram bem a quimioterapia, mas alguns efeitos secundários podem ocorrer como anorexia, toxicidade renal, alopecia, mielossupressão e síndrome de lise aguda do tumor. Assim, exames hematológicos e bioquímicos devem ser realizados periodicamente, com o intuito de evidenciar alterações sejam elas decorrentes da neoplasia ou dos efeitos do tratamento antineoplásico (HAYES, 2006a).

Em humanos, as disfunções hematológicas ocorrem comumente em pacientes com neoplasias malignas. Mais da metade dos pacientes são anêmicos devido às perdas sanguíneas agudas ou crônicas, comprometimento da medula óssea em decorrência de infiltração tumoral, mielossupressão secundária à quimioterapia ou radiação ou pela anemia da doença crônica e, com menos freqüência, a anemia pode ser o resultado da aplasia da medula, processos hemolítico ou esplenomegalia (JOHNSON; ROODMAN, 1989). Outras alterações hematológicas podem ser vistas em decorrência do comprometimento da medula óssea, resultando em citopenias múltiplas (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002). Essas alterações são consideradas SPN.

As SPN representam todas as alterações que ocorrem no organismo em conseqüência da neoplasia, em um local distante do tumor original ou por efeitos

remotos da doença, e que, conseqüentemente, resultam em manifestações clínicas que devem ser reconhecidas e tratadas. Quando diagnosticadas inicialmente, as SPN são um indicador de câncer em algum segmento do organismo (FINORA, 2003). A anemia é uma das SPN mais comumente vistas na oncologia veterinária e humana (BERGMAN, 2007). Além da anemia, outras SPN que podem ser encontradas com menor freqüência são leucocitose, eosinofilia, hipercalcemia e gamopatias (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002).

Segundo Bergman (2007), ainda que existam numerosas causas de anemia como SPN em pacientes veterinários e humanos, na maioria das vezes a anemia é associada à doença crônica, por perda sanguínea, imunomediada, ou por hemólise.

O processo de anemia na doença inflamatória crônica ou neoplásica é multifatorial. No geral, a medula óssea apresenta-se hipoproliferativa e ocorre indisponibilidade de ferro para a síntese de hemoglobina devido ao seqüestro do íon nos macrófagos (GABOR; CANFIELD; MALIK, 2000). Além disso verifica-se uma diminuição no tempo médio de vida das hemácias. A anemia apresenta-se como normocítica e normocrômica (BERGMAN, 2007). Alguns tumores, principalmente os do trato gastrintestinal, podem levar á perda de sangue. A anemia por perda de sangue caracteriza-se como microcítica e hipocrômica em decorrência da perda de eritrócitos e de ferro e diminuição dos níveis de hemoglobina (BERGMAN, 2007).

Em gatos com linfoma, a anemia pode estar presente também como resultado da infecção pelo FeLV. Os efeitos do FeLV podem ser diretos (citotoxicidade) ou indiretos, por meio da produção de moléculas que inibem a proliferação celular. A anemia associada ao FeLV em geral caracteriza-se como não regenerativa e pode apresentar-se como macrocítica (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002).

Gatos com linfoma também podem apresentar anemias hemolíticas. As anemias hemolíticas podem ser causadas por agentes infecciosos (ex. micoplasmas) ou reações imunomediadas contra os eritrócitos (KOHN et al., 2006). Nos gatos com linfoma, as alterações imunológicas decorrentes do linfoma e a imunossupressão decorrente do uso de agentes antineoplásicos podem ser indistinguíveis e ambas podem resultar em um risco importante para a ocorrência ou reativação de infecções latentes (DOBSON, 1998), como é o caso da infecção por micoplasmas.

Os recentemente denominados micoplasmas hemotrópicos felinos correspondem aos parasitos outrora classificados como *Haemobartonella felis,* identificados como agentes causadores da anemia infecciosa felina. O primeiro relato de um parasito epieritrocítico em felinos ocorreu em 1942, em um gato anêmico em Pietermaritzburg, África do Sul, o qual foi classificado como *Eperythrozoon felis* (CLARK, 1942). Posteriormente, outra descrição foi feita nos Estados Unidos, quando os pesquisadores reproduziram um anemia experimental em um gato, após inoculação de sangue de um outro felino anêmico, que apresentava no esfregaço sanguíneo corpúsculos circulares ou em forma de pequenos anéis, vírgulas ou bastonetes, aparentemente aderidos às hemácias, cuja aparência era muito similar ao *Anaplasma marginale* do gado (FLINT; MOSS, 1953).

Flint e McKelvie[1],(1953) apud SYKES, 2003, p. 773), sugeriram para este parasito, a utilização do nome *Haemobartonella felis*, já que, ao contrário das espécies *Eperythrozoon*, estes organismos dificilmente eram encontrados livres no plasma (SYKES, 2003). Até recentemente, esses parasitos eram classificados como rickéttsias, com base em seu pequeno tamanho, coloração Gram negativa, parasitismo de eritrócitos e a possível evidência de transmissão por artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2007a). Não obstante, a caracterização molecular baseada no seqüenciamento do gene 16S RNA ribossômico, das espécies *Haemobartonella* e *Eperythrozoon,* revelou sua proximidade com os membros da classe *Mollicutes* (SYKES, 2003; WILLI et al., 2007a). Assim, com base nas características fenotípicas tais como o pequeno tamanho do microrganismo e o genoma, a ausência da parede celular e o flagelo, resistência à penicilina e suscetibilidade às tetraciclinas, os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma,* como micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001).

Ante a existência de outros organismos que causam anemia nos gatos, Sykes (2003), sugeriu que os termos “hemobartonelose” e “anemia infecciosa felina” fossem abandonados e substituídos por “micoplasmose hemotrópica felina”. Considerando também que os micoplasma hemotrópicos representam um grupo

[1] FLINT, J. C.; MCKELVIE, D. H. Feline infectious anemia diagnosis and treatment. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 1953, Salt Lake City. Utah, 1953. p. 240-242.

diferente dentro do gênero *Mycoplasma,* em virtude de parasitar os eritrócitos, sugeriu-se a utilização do termo “hemoplasmas” (MESSICK, 2004).

Em decorrência do seqüenciamento do gene RNA 16S ribossômico, inicialmente foram descritos dois tipos distintos de micoplasmas em gatos, a cepa Ohio (*large form*) e a cepa Califórnia (*small form*), atualmente denominadas *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus* Mycoplasma haemominutum, respectivamente (WILLI et al., 2007a). Esses organismos diferem em características morfológicas, seqüências de DNA e patogenicidade. Em condições experimentais, *M. haemofelis* produziu intensa anemia hemolítica em gatos, enquanto a infecção pelo *Candidatus* M. haemominutum, nas mesmas condições, produziu anemia discreta a moderada. A anemia foi mais intensa na presença de coinfecção com os retrovírus, particularmente o FeLV (GEORGE et al., 2002). A manifestação de quadro mais grave de anemia por *Candidatus* M. haemominutum foi descrita também em um animal submetido a tratamento quimioterápico, no qual a doença concorrente (linfoma), o estresse (visitas freqüentes ao hospital) e/ou imunossupressão (prednisona e terapia antineoplásica), pioraram significativamente o quadro clínico da anemia ocasionada pelo micoplasma (LORIMIER; MESSICK, 2004).

O recentemente descoberto *‘Candidatus* Micoplasma turicensis foi descrito na Suíça, demonstrando-se a sua patogenicidade em gatos domésticos, causando anemia hemolítica moderada a intensa (WILLI et al., 2005). Posteriormente foi reconhecido outros países como o Reino Unido, Austrália, África do Sul (WILLI et al., 2006b), Japão (FUJIHARA et al., 2007), Brasil (HORA, 2008), e em felídeos selvagens na Espanha, Suíça, França, Tanzânia e Brasil (WILLI et al., 2007b). Estudos sugerem que fatores como a coinfecção pelo FIV e imunossupressão iatrogênica incrementam o potencial patogênico desse microrganismo nos gatos domésticos (WILLI et al., 2005).

De modo geral, os micoplasmas hemotrópicos são parasitos pleomórficos epicelulares, Gram negativos, com 0,3 a 0,8 µm de diâmetro, encontrados em depressões na membrana eritrocitária. Embora não possuam núcleo e parede celular, pequenos grânulos e algumas poucas estruturas filamentosas são encontras no seu citoplasma, o que permite que se liguem à célula hospedeira e adquiram os

aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas necessários á sua sobrevivência (MESSICK, 2004). O genoma do *M. hemofelis* é composto por 1245 kb (kilobases), mas existe variação entre os diversos micoplasmas, em geral de 580kb a aproximadamente 2000kb. A dupla fita de DNA provê a informação genética para a replicação, transcrição e síntese de proteínas, observando-se em seqüenciamentos que 21% dos genes são específicos para o transporte e funções metabólicas, 50% codificam proteínas para a replicação, divisão celular, transcrição e translação e um considerável número de genes se encarregam de produzir adesinas e vários sistemas genéticos que provem uma variabilidade de antígenos de superfície que lhes ajudam a evadir o sistema imune (MESSICK, 2004).

As vias de transmissão dos micoplasmas hemotrópicos ainda não são completamente conhecidas. A transmissão experimental pode ocorrer por inoculação pelas vias intravenosa, intraperitoneal e oral, de sangue fresco contaminado (TASKER, 2006a; GENTILINI et al., 2008).

Existem evidências da presença de DNA dos micoplasmas (*M. haemofelis* e *Candudatus* M. haemominutum) em pulgas (*Ctenocephalides felis*) adultas, larvas, ovos e também em suas fezes, evidenciando o possível papel desses ectoparasitos hematófagos como agentes transmissores dos micoplasmas hemotrópicos (WOODS et al., 2005; WOODS; WISNEWSKI; LAPPIN, 2006), entretanto, a tentativa de transmissão experimental entre gatos por meio da atividade hematófaga das pulgas não foi conclusiva. Somente um animal em seis estudados, tornou-se positivo para *M. haemofelis* (pela técnica de PCR), sem a manifestação de sintomas ou alterações hematológicas (WOODS et al., 2005). Em outro estudo, nenhum animal exposto ao desafio, tornou-se positivo (WOODS; WISNEWSKI; LAPPIN, 2006).

A transmissão vertical das mães à ninhada também tem sido descrita, mas se desconhece se esta ocorre transplacentariamente, durante o parto e/ou aleitamento (TASKER, 2006a). Além disso, descreveu-se a presença de DNA do *Candidatus* M. haemominutum, na saliva e nas glândulas salivares de gatos infectados, reforçando a hipótese que a saliva possa ser uma via de transmissão deste micoplasma (DEAN et al., 2008), á semelhança do que foi previamente postulado para o *Candidatus* M. turicensis (WILLI et al., 2006a). A transmissão iatrogênica também pode ocorrer, por meio de transfusões sangüíneas, logo, todos os animais deveriam ser testados para

a presença das três espécies de micoplasma, antes de serem considerados potenciais doadores (TASKER, 2006a).

A micoplasmose hemotrópica felina pode ocorrer em animais de diversas idades, encontrando-se algumas vezes relatos de acometimento de animais jovens (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990; SYKES, 2003), e outras vezes de animais idosos (TASKER et al., 2003a; BAUER et al., 2008). Os machos parecem ser mais acometidos que as fêmeas, em decorrência dos hábitos de deambulação e o possível envolvimento em brigas (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990; WILLI et al., 2006a). A infecção pelos retrovírus FIV e FeLV tem sido associada por alguns autores, com o incremento no risco de infecção pelos micoplasmas (VANSTEENHOUSE; TABOADA; MILLARD, 1993; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002; BAUER et al., 2008; MACIEIRA et al., 2007). A inter-relação da infecção pelos micoplasmas e o FeLV pode estar associada a uma supressão da resposta imune causada pelo vírus, o que aumentaria a suscetibilidade do animal aos micoplasmas, ou levaria à reativação de uma infecção latente (GRINDEM; COBERTT; TOMKINS, 1990). No Brasil, existe o relato de um paciente humano HIV positivo, anêmico e infectado por *Mycoplasma haemofelis–like* e *Bartonella henselae* (DOS SANTOS et al., 2008). Embora seja reconhecida a associação dos hemoplasmas com estados imunossupressivos ou doenças concomitantes, sabe-se que alguns gatos infectados não apresentam um fator predisponente, e nesses casos, o micoplasma (particularmente *M. haemofelis*) pode ser considerado o patógeno primário (TASKER, 2006a).

Com relação à prevalência da micoplasmose hemotropica felina, inferida em diferentes estudos internacionais, oscila entre 17 a 38% na America do Norte (JENSEN et al., 2001; KEWISH et al., 2004; ISHAK; RADECKI; LAPPIN, 2007; REYNOLDS; LAPPIN, 2007; SYKES et al., 2007; SYKES et al., 2008b) e 14 a 21,1% no Reino Unido (TASKER et al., 2003a; WILLI et al., 2006b; PETERS et al., 2008). Em estudos isolados, relata-se 27,8% (n= 73/263) na Alemanha (BAUER et al., 2008); 18,9% (n=58/307) na Itália (GENTILINI et al., 2008); 58,33% (n= 35/60) no Japão (FUJIHARA et al., 2007); 19,9% (n=66/331) na Korea (YU et al., 2007); 38,8% (n=57/147) na Austrália (TASKER et al., 2004); e 78,2% (n=54/69) na África do Sul (LOBETTI; TASKER, 2004) e 11,64% (n=83/713) na Suíça (WILLI et al., 2006a). No

Brasil, a prevalência da micoplasmose hemotropica felina variou em decorrência da região. Em Botucatu (São Paulo) observou-se uma prevalência de 14,9% (n=23/154) (BATISTA, 2004), no Rio de Janeiro a prevalência foi de 12% (n=18/149) (MACIEIRA et al., 2007) e finalmente na cidade de São Paulo foi de 9,2% (n=25/270) (HORA, 2008).

Os sintomas da doença são inespecíficos e muitas vezes conseqüentes ao quadro de anemia. Apatia, anorexia, palidez de mucosas, perda de peso, taquicardia, esplenomegalia, febre, alteração nos sons cardíacos e icterícia podem ser observadas (SYKES, 2003). Acredita-se que a presença dos microrganismos nos eritrócitos circulantes estimule uma forte atuação do sistema mononuclear fagocitário, principalmente o baço, onde são seqüestrados os eritrócitos que se encontram parasitados, culminando com aumento de volume do órgão e flutuações do volume globular (SYKES, 2003). Dessa forma, a anemia ocorre primariamente como resultado da destruição extravascular dos eritrócitos, por meio dos macrófagos no baço, fígado, pulmões e medula óssea. Além disso, associada às alterações diretas promovidas pelos parasitos, a exposição de epitopos da membrana eritrocitária, normalmente não expostos, pode ocasionar a formação de anticorpos antieritrocitários. Assim, a resposta imune torna-se extremamente importante no desenvolvimento da doença (HARVEY, 2006).

Para o diagnóstico, o único método anteriormente disponível era a demonstração do microrganismo na superfície dos eritrócitos, no exame microscópico dos esfregaços sanguíneos, com a utilização de métodos de coloração como Giemsa, Wrigth, laranja de acridina, entre outros. Os microrganismos são encontrados na superfície dos eritrócitos isoladamente, em pares ou em cadeias, no caso de parasitismo intenso (TASKER; LAPPIN, 2002). Como procedimento diagnóstico, a análise do esfregaço sanguíneo apresenta várias desvantagens como a confusão na identificação dos parasitos com artefatos de técnica produzidos pela coloração, corpúsculos de Howell-Jolly e as perdas dos parasitos após exposição prolongada dos eritrócitos ao EDTA, utilizado nas colheitas de sangue (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

Segundo Tasker (2006a), um estudo desenvolvido na Universidade de Bristol indicou que nas amostras de sangue em que se utilizavam anticoagulantes como

EDTA e heparina, ocorria a perda dos microrganismos. Sugeriu-se que a perda não seria apenas devida a efeitos específicos do EDTA, e sim, à provável morte dos microrganismos poucas horas após a colheita da amostra. Logo, a análise citológica dos esfregaços sanguíneos é considerada como um teste de baixa sensibilidade e especificidade (TASKER; LAPPIN, 2002). Contudo, nos casos em que por disponibilidade ou custo, não possam ser realizados testes moleculares e os parasitos não sejam identificados nos esfregaços, o diagnóstico muitas vezes tem sido feito simplesmente por suspeição, frente a um quadro de anemia regenerativa, com presença de eritroblastos. Entretanto, deve-se lembrar que os casos de anemia independente da presença ou não de regeneração medular devem ser avaliados quanto à infecção pelos micoplasmas e/ou os retrovírus (HORA, 2008).

Além da dificuldade da análise dos esfregaços sanguíneos, a impossibilidade de cultivar os micoplasmas hemotrópicos *in vitro* limitou seriamente o desenvolvimento de outros testes diagnósticos (PETERS et al., 2008). Apenas com o advento das técnicas moleculares, abriu-se a possibilidade do diagnóstico definitivo da infecção pelos micoplasmas hemotrópicos, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes de PCR baseiam-se na identificação do gene RNA16S ribossômico, a partir da extração do DNA, com vários e diferentes pares de *primers* (senso e anti-senso) já descritos.

Para o diagnóstico de *M. haemofelis, a PCR* foi desenvolvida na Universidade de Illinois (MESSICK; BERENT; COOPER, 1998). Para o diagnóstico do *Candidatus* M. haemominutum, a PCR foi desenvolvida na Universidade de Califórnia-Davis (FOLEY et al., 1998) e para o diagnóstico do *Candidatus* M. turicensis, a técnica foi desenvolvida na Universidade de Zurich (Suíça) (WILLI et al., 2005). Além do diagnóstico, a PCR pode ser usada como uma técnica quantitativa (PCR em tempo real) que mede a quantidade do DNA do hemoplasma presente no sangue dos animais, o que pode ajudar a diferenciar infecção e doença, considerando-se a reconhecida existência de gatos assintomáticos portadores crônicos (TASKER et al., 2003b; TASKER, 2006a). A PCR em tempo real tem sido realizada em outros materiais biológicos, além das amostras de sangue total, como por exemplo, em glândulas salivares e na própria saliva (DEAN et al., 2008) e até mesmo em esfregaços sanguíneos de gatos naturalmente infectados pelos

hemoplasmas, embora com menor sensibilidade se comparada à técnica realizada com sangue total (SYKES et al., 2008a). Recentemente tornou-se possível a identificação dos micoplasmas em amostras de sangue total sem procedimentos prévios de extração do DNA, tanto na PCR padrão quanto na PCR em tempo real, reduzindo o tempo, o custo, e o trabalho técnico necessário para o processamento das amostras. Embora com uma sensibilidade menor, a técnica pode ser utilizada como procedimento de rotina nos laboratórios, com execução muito mais rápida e prática quando comparada com as amostras de DNA extraídas tradicionalmente (WATANABE et al., 2008).

O tratamento para a micoplasmose hemotrópica é indicado para os gatos sintomáticos e com alterações laboratoriais compatíveis com a doença. O tratamento dos animais PCR positivos e sadios não é recomendado (SYKES, 2003). O tratamento é feito com tetraciclinas e derivados por via oral ou parenteral (VANSTEENHOUSE; TABOADA; MILLARD, 1993). A doxiciclina reduz os sintomas da doença e diminui o número de parasitos no sangue. A dose recomendada é de 5-10 mg/kg diariamente, via oral durante 21 dias (TASKER; LAPPIN, 2002), Descreve-se também como efetiva a enrofloxacina (DOERS et al., 2002) e a marbofloxacina (TASKER et al., 2006b; ISHAK et al., 2008), contudo deve-se ressaltar que nenhum tratamento antibiótico parece eliminar definitivamente a infecção pelos micoplasmas hemotrópicos (WILLI et al., 2007a) e a ausência do controle da causa de base, que pode desencadear a doença, contribui para que a infecção se mantenha. Além disso, a anemia causada pelos micoplasmas apresenta também um componente imunomediado, de tal modo que a terapia com corticóides pode ser indicada, em conjunto com a terapia antibiótica (VANSTEENHOUSE; TABOADA; MILLARD, 1993; TASKER, 2006a).

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram estudados animais com e sem definição racial, machos ou fêmeas, de idades variadas, previamente diagnosticados com linfoma, por exame citológico ou histopatológico, e considerou-se como critério de inclusão, que não apresentassem tratamentos prévios para a neoplasia em questão.

O projeto obedeceu aos princípios de bioética e bem estar animal estabelecidos pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

1.1 GRUPO EXPERIMENTAL

Foram incluídos neste estudo, oito felinos provenientes do atendimento nos Serviços de Pronto Atendimento Médico e Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e seis felinos provenientes do atendimento de outro hospital escola e de clínicas particulares.

1.2 GRUPO CONTROLE

Foram obtidas amostras de sangue de 14 gatos clinicamente normais, domiciliados ou provenientes de gatis, com ou sem definição racial, cuja anamnese e parâmetros hematológicos e bioquímicos os mostrassem como animais hígidos. As amostras de sangue foram submetidas aos mesmos procedimentos realizados para o grupo experimental.

1.3 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram realizados anamnese e exame físico de acordo com o protocolo do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. Após o exame físico, no caso dos animais sadios, e o diagnóstico de linfoma no grupo experimental, foram colhidos 5,0 mL de sangue por punção venosa jugular, sendo que 2,0 mL de sangue foram acondicionados em frasco contendo EDTA a 10% para realização do hemograma e o restante do sangue (3,0mL), mantido em frasco siliconizado sem anticoagulante, foi centrifugado para obtenção de soro sangüíneo para realização das demais provas laboratoriais. As lâminas para exame do esfregaço sangüíneo foram feitas com sangue *in natura* no momento da colheita. O sangue do tubo com EDTA foi estocado sob refrigeração por um período máximo de duas semanas, para o processo de extração do DNA e posterior realização da PCR.

1.4 EXAMES COMPLEMENTARES

Os exames complementares realizados estão descritos nos tópicos abaixo relacionados.

1.4.1 Exame citológico

Os linfonodos aumentados de volume foram puncionados com agulha 25 x 0,7mm para colheita do material. O conteúdo obtido, após extensão em lâmina para esfregaço, foi corado pela técnica de Rosenfeld e analisado em microscópio óptico.

1.4.2 Exame histopatológico para diagnóstico de linfoma

Nos casos em que não se evidenciou linfonodomegalia, ou naqueles em que a punção aspirativa por agulha fina não tinha indicação como procedimento diagnóstico, foi necessária a realização de exame histopatológico. Os animais foram encaminhados ao Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ-USP, onde foram submetidos ao procedimento cirúrgico para colheita de material para exame histopatológico. Após fixação em formol a 10%, o material foi encaminhado ao Serviço de Patologia para processamento, sendo impregnado por parafina e processado por técnicas rotineiras. As lâminas foram coradas por hematoxilina- eosina.

1.4.3 Hemograma

A contagem de células sangüíneas foi determinada em contador automático ABC Vet® (Horiba ABX – São Paulo – Brasil) de uso veterinário. A contagem diferencial dos leucócitos e a avaliação morfológica de hemácias e leucócitos foram realizadas em esfregaço sangüíneo *in natura*, corado pelo corante de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

1.4.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automático (Lyasis - Roche®), de acordo com os padrões do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, utilizando-se, quando necessário, *kits* comerciais. Essas análises envolveram a avaliação renal (uréia e creatinina) e hepática (proteínas totais, albumina, alanina

aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina).

- Alanina aminotransferase (ALT): Biosystems – método cinético ultravioleta.
- Albumina: método colorimétrico do Verde de Bromocresol.
- Aspartato aminotransferase (AST): Biosystems – método cinético ultravioleta.
- Creatinina: método colorimétrico de Jaffé modificado (picrato alcalino).
- Fosfatase Alcalina (ALP): Biosystems – método cinético colorimétrico.
- Gamaglutamil transferase (GGT): Diasys – método cinético colorimétrico.
- Proteínas séricas totais: método colorimétrico do Biureto.
- Uréia: método enzimático da Urease / GLDH, em ultravioleta: Diasys.

1.4.5 Avaliação da infecção pelos retrovírus

O teste sorológico (ELISA) SNAP Combo® FeLV/FIV da IDEXX para detecção de anticorpos anti-FIV e proteína p27 do FeLV, foi utilizado para determinar a infecção concomitante com o vírus da imunodeficiência felina e/ou o vírus da leucemia viral felina, respectivamente. Os testes foram realizados com amostras de soro, seguindo-se as instruções do fabricante.

1.5 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Todos os procedimentos para o diagnóstico molecular, como as provas de PCR e PCR-Nested, analise do produto amplificado, purificação, seqüenciamento e precipitação do DNA, foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular

Aplicada e Sorologia (LABMAS) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP.

1.5.1 Extração do DNA

Para a detecção do *Mycoplasma* spp. nas amostras de sangue, foi realizada a extração do DNA com o *kit illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit* da GE Healthcare (Figura 1), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, a saber:

Figura 1 - *Kit* para extração de DNA de amostras sangüíneas (Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit da GE Healthcare)

- **Lise das hemácias**: As amostras de sangue foram colocadas em homogeneizador de sangue AP 22 (PHOENIX®) durante 10 minutos e, a seguir, em tubos *eppendorf* de 1500 µL previamente identificados para cada amostra. Montaram-se 200 µL de sangue com EDTA, aos quais adicionaram-se 20 µL de Proteinase K (lise de proteínas) (Figuras 2A e 2B), cuja preparação prévia foi feita com 1,5 mL de água ultrapura auto-clavada obtida do MilliQ®. Foram adicionados 400 µL da solução de lise e, em seguida, as amostras foram mantidas em repouso por 10 minutos à temperatura

ambiente. Realizou-se uma agitação das amostras por 10 segundos em um agitador de tubos AP56 (PHOENIX®), a cada 5 minutos, durante o processo de repouso, para auxiliar o efeito da solução de lise sobre os eritrócitos.

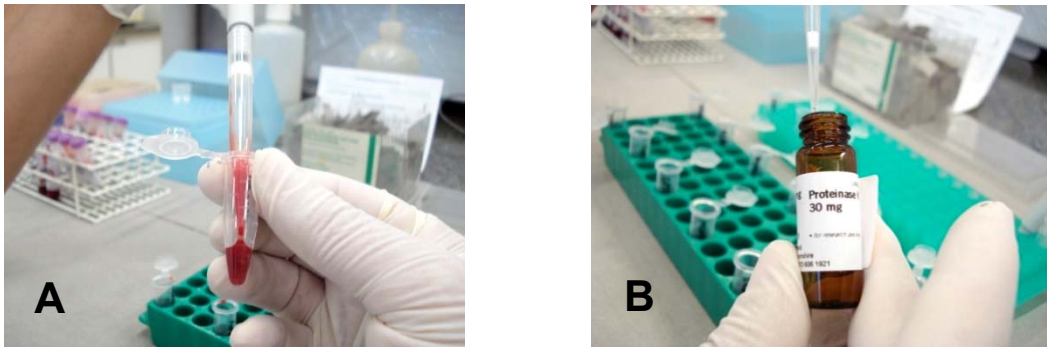

Figura 2 - (A) Montagem das amostras de sangue nos tubos e (B) aplicação da Proteinase K em cada *eppendorf* previamente identificado

- **"Carregar e Adsorver"**: Foram montados os tubos coletores e as colunas de purificação presentes no *kit*, para cada amostra (Figura 3A). Após o término do tempo da lise, adicionou-se todo o conteúdo dos *eppendorfs* nos respectivos tubos coletores (Figura 3B). Realizou-se a centrifugação do conteúdo dos tubos em centrifuga 5417R (*eppendorf*®), a 11000*g* durante um minuto. Após a centrifugação, foi eliminado o conteúdo dos tubos coletores, utilizando-os novamente para cada respectiva coluna.

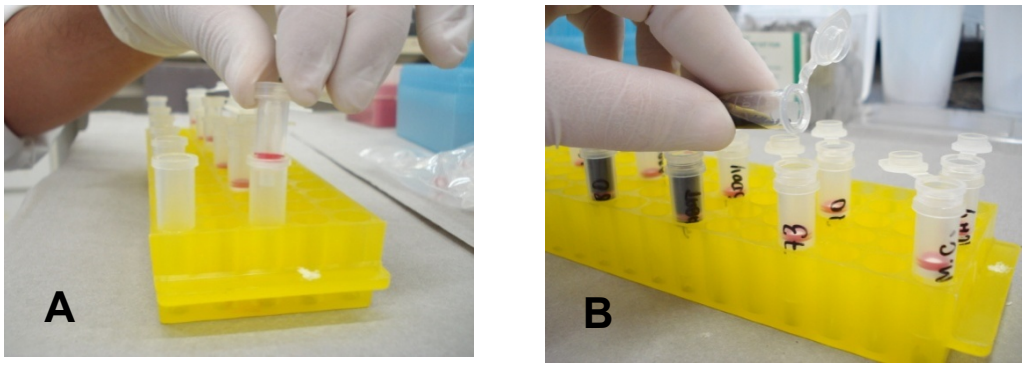

Figura 3 - (A) Montagem das colunas de extração nos tubos coletores. (B) Forma de "carregar" os tubos coletores com o produto da lise das hemácias

- **Primeira lavagem**: Adicionaram-se novamente 500 µL da solução de lise, centrifugando-se a 11000*g* durante um minuto e eliminando-se o centrifugado.

- **Segunda lavagem**: Para cada coluna com o seu respectivo tubo coletor, adicionaram-se 500 µL da solução tampão para lavagem, contida no *kit.* Centrifugou-se a 11000*g* durante 3 minutos. Após esta última centrifugação, os tubos foram mantidos abertos por 5 minutos, à temperatura ambiente, para assegurar a completa eliminação e/ou evaporação da solução tampão que contem etanol, a qual pode danificar o processo de purificação do DNA.

- **Purificação ou separação do DNA**: Disponibilizaram-se novos tubos tipo *eppendorf* onde foram transferidas as colunas de purificação (Figura 4A). Adicionaram-se 200 µL da solução tampão do *kit*, previamente aquecida a 70ºC. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por um minuto, e finalmente levados a centrifugar a 11000*g* por um minuto. Após a centrifugação, o conteúdo filtrado pela coluna correspondeu ao resultado da extração do DNA, o qual foi estocado a -20 ºC até o seu uso para a PCR (Figura 4B).

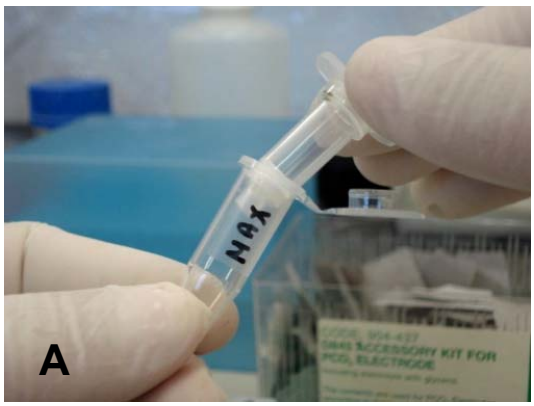

Figura 4 - (A) Transferência das colunas de purificação a novos tubos *eppendorf*. (B) Obtenção do filtrado de DNA para estocagem

1.5.2 Controles positivo e negativo para a reação da PCR

A amostra de DNA utilizada como controle positivo foi obtida de um gato anêmico, proveniente do atendimento do HOVET-USP em setembro de 2006, estocada a -20°C, registrada no GenBank com o número EU442639, e gentilmente cedida pela M.V. Msc. Aline Santana da Hora (Anex

Em todas as reações foram utilizados controles negativos constituídos por água ultra pura do MilliQ® mais a combinação dos reagentes da PCR.

1.5.3 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

Para a detecção dos micoplasmas foram utilizados os *primers* PCR e PCR-Nested descritos por Messick, Berent e Cooper (1998), indicados no quadro 1, sendo estes universais e capazes de amplificar fragmentos de 1316 pb para a PCR, e 675 pb no caso da PCR-Nested, do gene que codifica o RNA ribossômico 16S da *Hemobartonella felis* (antigo nome dado ao *Mycoplasma haemofelis)* (GenBank acesso número U95297). Após uma primeira amplificação utilizaram-se *primers H. felis-f1* (senso) e *H. felis-r2* (antisenso) e na segunda reação fHf5 (senso) e rHf6 (*antisenso).*

Nome do primer	***Seqüência do primer***	***Posição segundo a seqüência em H. felis***
H. felis-f1	*gac ttt ggt ttc ggc caa gg*	*61→79*
H. felis-r2	atg tat ttt taa atg ccc act c	1356→1377
fHf5	agc agc agt agg gaa tct tcc ac	335→357
rHf6	tgc acc acc tgt cac ctc gat aac	986→1009

Fonte: Messik, Berent, Cooper (1998)
Quadro 1 - *Primers* utilizados para a amplificação do 16S RNA

A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador (PTC-200 MJ Research®). Os tempos e as temperaturas empregadas para a amplificação do DNA repetiram o seguinte ciclo: 94ºC por 10 minutos para a desnaturação inicial, 30 ciclos de 94ºC por um minuto para a desnaturação; 50ºC por 30 segundos para hibridação dos nucleotídeos iniciadores; 72ºC por um e meio minutos para a extensão e uma elongação final a 72ºC por cinco minutos. Posteriormente a esta primeira PCR, colheu-se 0,5µL de cada produto amplificado para novos tubos *eppendorf* e, junto a um novo *Mix*, foi realizada a segunda PCR-Nested que seguiu a seguinte seqüência: 94ºC por 10 minutos para a desnaturação inicial; 30 ciclos de 94ºC por um minuto, 57,5ºC por 30 segundos para hibridação; 72ºC por um e meio minutos para a extensão e uma elongação final de 72ºC por cinco minutos.

Os componentes utilizados para a mescla dos reagentes ou *Mix* para o desenvolvimento das rações são ilustrados nos quadros 2 e 3 respectivamente.

Componentes	**Volume final em µL para uma amostra**
Tampão PCR 10x	2,5
dNTPs 1,25 mM	4,0
$MgCl_2$ 50 mM	0,75
Primer H. felis-f1 10 µM	0,625
Primer H. felis-r2 10 µM	0,625
Platinum Taq polimerase 5U/µL	0,125
Água ultrapura q.s.p. 25 µL	11,375
Amostra de DNA	5,0

Quadro 2 - Componentes do *Mix* para a PCR

Componentes	**Volume final em µL para uma amostra**
Tampão PCR 10x	2,5
dNTPs 1,25 mM	4,0
$MgCl_2$ mM	0,75
Primer fHf5 10 µM	0,625
Primer rHf6 10 µM	0,625
Platinum Taq polimerase 5U/µL	0,125
Água ultrapura q.s.p. 25 µL	15,875
Produto da PCR	0,5

Quadro 3 - Componentes do *Mix* para a PCR-Nested

1.5.4 Analise do produto amplificado

Os produtos gerados na amplificação a partir das técnicas utilizadas, à razão de 10µL de cada, foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5x (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8,0), sob voltagem constante de 100 mV. As bandas de 675pb foram visualizadas em transiluminador ultravioleta, 20 minutos após a imersão do gel em uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL, utilizando-se o marcador molecular de tamanho de DNA de 100pb.

1.5.5 Purificação do DNA

A banda positiva correspondente á amplificação de *Mycoplasma* spp. obtida pela PCR-Nested, foi identificada e corrida novamente para PCR-Nested com o produto da primeira PCR, mas com uma combinação dos reagentes e a amostra ao dobro, obtendo um produto final de 50 µL. Assim realizou-se novamente a eletroforese e confirmando-se novamente a sua positividade, a banda foi recortada do gel de agarose, e posteriormente purificada, mediante o uso do *kit* comercial *illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band PURIFICATION KIT* da GE Healthcare. A banda observada na eletroforese foi colocada num *eppendorf* de 1500 µL, ao qual tinha sido previamente adicionado 300 µL da solução tampão 1 do *kit*; levou-se a 60ºC por 15 minutos, realizando-se agitações rápidas no vórtex a cada 5 minutos, e, finalizando com uma centrifugação rápida (*spin*). Foi disponibilizado um tubo coletor com a sua respectiva coluna de filtração, onde foi adicionado todo o conteúdo resultante do *eppendorf* e deixado à temperatura ambiente por um minuto. Após centrifugação a 20000*g* durante um minuto, o líquido filtrado foi eliminado, deixando a coluna novamente no tubo coletor para posterior adição de 500 µL da solução tampão do *kit* e centrifugado novamente a 20000*g* por um minuto. Em seguida, o tubo coletor foi eliminado. Transferindo-se a coluna a um novo tubo *eppendorf*, agregou-se 30 µL do tampão de eluição 6 (solução do *kit*) deixando-se a

temperatura ambiente durante um minuto. Após uma última centrifugação a 20000*g* por dois minutos, armazenou-se o conteúdo do *eppendorf* a -20 ºC, até o processo do seqüenciamento.

1.5.6 Seqüenciamento do DNA

A reação do seqüenciamento foi realizada no termociclador *Mastercycler Gradiant eppendorf*®. Utilizaram-se oligonucleotideos já marcados para seqüenciamento *BigDye® Terminator v.31 Cycle Sequecing Kit*. As condições dos reagentes do *mix* para seqüenciamento, dos *primers* senso e antisenso, se apresentam no quadros 4 e 5 respectivamente.

***Mix* Senso**	
Reagentes	**Quantidade (µL)**
Big Dye®	4,0
Sequencing buffer 5x	4,0
Primer senso fHf5 10 µM	0,5
DNA alvo	11,5

Quadro 4 - Componentes do *Mix* para a reação do *primer* senso de seqüenciamento

Mix Anti-senso	
Reagentes	**Quantidade (µL)**
Big Dye®	4,0
Sequencing buffer 5x	4,0
Primer antisenso rHf6 10 µM	0,5
DNA alvo	11,5

Quadro 5 - Componentes do *Mix* para a reação do *primer* antisenso de seqüenciamento

As condições térmicas para a PCR de seqüenciamento estão arroladas no quadro 6.

Etapa	Temp. ºC	Tempo	Ciclos
Desnaturação	96	1 min	1
Hibridação	96	15 seg	40
	50	15 seg	
Extensão	60	4 min	

Quadro 6 - Condições térmicas para a PCR de seqüenciamento. Temp: temperatura, min: minutos, seg: segundos

1.5.7 Precipitação do DNA

Após a reação de seqüenciamento, foi realizada a precipitação do DNA amplificado. Adicionaram-se 80µL de isopropanol 75% a cada tubo da reação senso e antisenso. Realizou-se homogeneização no vórtex e centrifugação rápida (*spin*), deixando em incubação à temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 25000*g* durante 25 minutos a uma temperatura de 25 ºC. Após a centrifugação, removeu-se o liquido sobrenadante deixando só o sedimento (*pellet*) no fundo do *eppendorf*. Adicionaram-se 250µL de etanol 70%, com o intuito de realizar lavagem do *pellet*. Após uma rápida homogeneização em vórtex, os tubos foram centrifugados a 25000*g* durante 10 minutos, a uma temperatura de 25ºC. Novamente retirou-se o excesso de líquido. O *pellet* permaneceu nos tubos abertos, por 5 minutos a 95ºC e mais 5 minutos á temperatura ambiente para secagem completa. Após o processo de precipitação, o resultado do seqüenciamento foi obtido em seqüenciador automático (ABISPrimTM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, EUA).

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso da amostra foram avaliados com relação à sua qualidade no aplicativo Phred online (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph), e em seguida, analisados

e editados manualmente no programa Chromas v.2.23 (http://www.technelysium.com.au/chromas.html), com a finalidade de observar e corrigir possíveis erros de interpretação e discrepâncias da fita seqüenciada. A seqüência final da amostra foi obtida com o aplicativo Cap-contig do programa computacional BioEdit v.5.0.9 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), e submetida à pesquisa de identidade com outras seqüências depositadas no GenBank, utilizando-se o programa Blast 2.0.10 (http://www.ncbi.nml.nih.gov/blast/).

1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, os dados foram tabulados por meio do programa computacional MiniTab® Release 14.12.0.

Os valores do eritrograma dos animais avaliados foram analisados descritivamente, obtendo-se a média, desvio padrão, erro padrão da média e os quartis. Analisou-se se a distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Anderson-Darling. Os parâmetros que apresentaram uma distribuição normal foram submetidos à análise de variância. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste t para duas amostras. Os parâmetros que não seguiram uma distribuição normal foram analisados pelo teste não paramétrico Mann-Whitney.

Para todas as analises foi considerado um nível de significância menor que 5% ($p<0,05$).

2 RESULTADOS

A identificação dos felinos com linfoma que compuseram o grupo experimental, constituído por 14 animais adultos, encontra-se descrita no quadro 7. Considerou-se a classificação do linfoma, positividade na pesquisa de *Mycoplasma* spp. e o *status* com relação à infecção pelos retrovírus.

Com relação às raças, o grupo experimental foi constituído por um persa, dois siameses e 11 animais sem raça definida, sendo oito fêmeas e seis machos. A média e o desvio padrão da idade do grupo foi 7,9 ± 4,2 anos. A freqüência de infecção pelo *Mycoplasma* spp. foi 7,14% (1/14). Com relação aos retrovírus 21,42% (3/14) foram positivos para FeLV e 7,14% (1/14) para o FIV. A idade média dos gatos afetados pelo FeLV foi de 3 anos. O gato FIV positivo tinha 11 anos de idade e o único animal positivo para micoplasmose hemotrópica tinha 2 anos.

O grupo controle foi constituído por 14 felinos adultos, todos sem raça definida, sendo 10 fêmeas e quatro machos, com idade média e desvio padrão de 6,1 ± 3,5 anos. Nenhum desses animais apresentou reação positiva na pesquisa para *Mycoplasma* spp, e também não apresentaram testes sorológicos positivos para os retrovírus.

Considerando a classificação dos linfomas, as freqüências de apresentação foram 50%, 35%, 14,2% para os linfomas nodal, alimentar e extranodal respectivamente. O linfoma mediastinal não teve representação no presente estudo.

Os valores obtidos no hemograma dos animais dos grupos experimental e controle encontram-se arrolados nos apêndices A e B, respectivamente, enquanto os dados referentes ao perfil bioquímico séricos estão dispostos nos apêndices C e D. Os valores considerados de referência para o hemograma foram aqueles descritos por Jain (1993), e para o perfil bioquímico sérico, os descritos por Kaneko et al. (1997).

Nome	Idade	Sexo	Raça	*Mycoplasma* spp.	Classificação	FeLV	FIV
Bankushinza	8a	Fêmea	SRD	Neg	Nodal	Neg	Neg
Henrique	2a	Macho	SRD	*M. haemofelis*	Nodal	Pos	Neg
Kika	13a 11m	Fêmea	SRD	Neg	Extranodal (cutâneo)	Neg	Neg
Kuk	3a 3m	Macho	Siamês	Neg	Alimentar	Neg	Neg
Midras	6a 3m	Macho	Persa	Neg	Alimentar	Neg	Neg
Minie	11a	Fêmea	SRD	Neg	Alimentar	Neg	Neg
Miu	14a 6m	Fêmea	Siamês	Neg	Nodal	Neg	Neg
Negão	11 a	Macho	SRD	Neg	Nodal	Neg	Pos
Oliver	8a 1m	Macho	SRD	Neg	Alimentar	Neg	Neg
Panda	1a 4m	Macho	SRD	Neg	Nodal	Pos	Neg
Rany	5a 7m	Fêmea	SRD	Neg	Nodal	Pos	Neg
Riqueza	10a 2m	Fêmea	SRD	Neg	Nodal	Neg	Neg
Tamy	4a 7m	Fêmea	SRD	Neg	Extranodal (nasal)	Neg	Neg
Timinha	12a	Fêmea	SRD	Neg	Alimentar	Neg	Neg

a: ano (s); m: mês (es); SRD: sem raça definida; Neg: negativo, Pos: positivo; Linf: linfonodo.

Quadro 7 - Identificação, classificação do linfoma, positividade na pesquisa de *Mycoplasma* spp, e teste sorológico para os retrovírus FeLV e FIV, nos felinos com linfoma – São Paulo – 2009

Dos 14 animais que compuseram o grupo experimental, quatro (28,6%) apresentaram anemia no momento do diagnóstico do linfoma.

As descrições estatísticas: média, mediana, desvio padrão, primeiro e terceiro quartis dos valores do eritrograma de ambos os grupos encontram-se dispostos na tabela 1, assim como o valor de *p* obtido na comparação entre os mesmos.

Tabela 1 - Valores de média, desvio padrão, mediana, primeiro e terceiro quartis, nível de significância (*p*) e de referencia das variáveis do eritrograma dos animais com linfoma e do grupo controle – São Paulo – 2009

Variável	Grupo Linfoma n = 14		Grupo Controle n = 14		Valor de *p*	Valores de referência*
	Média ± DP	Mediana (Q_1 - Q_3)	Média ± DP	Mediana (Q_1 - Q_3)		
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	6,3 ± 2,0 ^{A}	6,6 (4,6 - 7,8)	8,3 ± 1,6 ^{B}	8,4 (6,6 - 9,8)	**0,012**	5,0 – 10,0
Volume globular (%)	29,2 ± 7,8 ^{A}	31 (20,7 - 35,5)	36,4 ± 6 ^{B}	37 (30,7 - 42,2	**0,012**	24 – 45
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 2,4 ^{A}	10 (7,0 - 11,2)	12,1±2 ^{B}	12,8 (10,3 - 13,7)	**0,004**	8,0 – 15,0
V.C.M (fL)	47,1 ± 5,9	45,7 (43,4 - 48,7) ^{A}	44,3 ± 4,1	44,2 (40,4 - 47) ^{A}	0,241	39,0 – 55,0
H.C.M (pg)	15,3 ± 1,8 ^{A}	15,1 (14,1 - 16,1)	14,8 ± 1,5 ^{A}	15 (13,7 - 15,5)	0,428	12,5 – 17,5
C.H.C.M (%)	32,6 ± 2	32,5 (30,7 - 34,2) ^{A}	33,4 ± 1,6	34,1 (31,3 - 34,6) ^{A}	0,260	30,0 – 36, 0

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam resultados com diferenças significativas ($p<0,05$) em cada grupo.

V.C.M= volume corpuscular médio, H.C.M.= hemoglobina corpuscular média, C.H.C.M.= concentração de hemoglobina corpuscular média.

DP= desvio padrão, Q_1= primeiro quartil, Q_3= terceiro quartil.

* Jain, 1993.

Observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os grupos, com relação à contagem global de eritrócitos, volume globular e hemoglobina. Esses parâmetros mostraram-se mais baixos nos animais com linfoma. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos, para os valores de V.C.M, C.H.C.M e H.C.M, que, em média, apresentaram-se dentro dos valores de normalidade.

Seguem abaixo, as ilustrações gráficas em diagramas de blocos das dispersões dos parâmetros do eritrograma entre os grupos linfoma e controle, com seu respectivo valor de significância, e contidos dentro dos parâmetros de referência adotados (linhas intermitentes). Representando-se assim os parâmetros com diferenças estatísticas como a contagem de eritrócitos, volume globular e hemoglobina nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

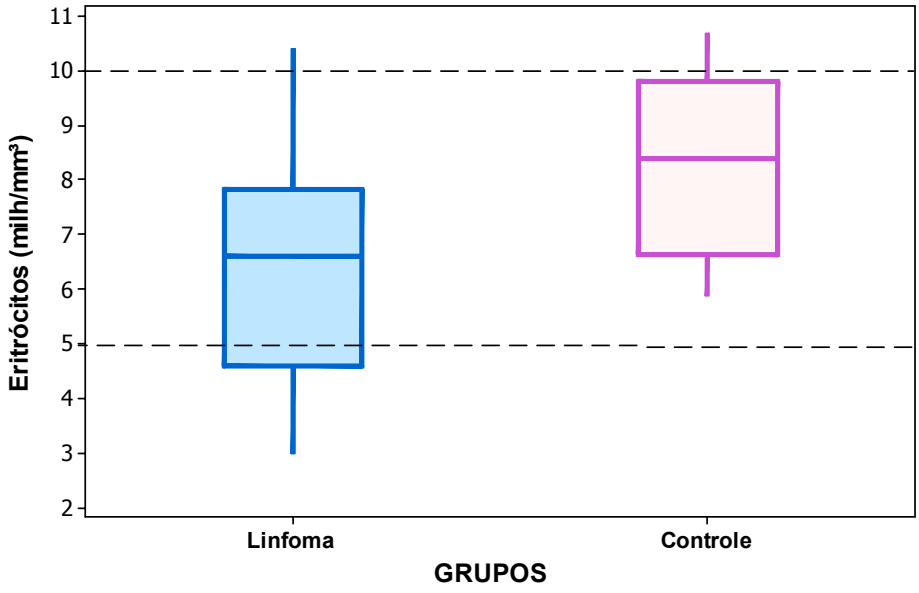

Figura 5 - Diagrama de blocos da contagem global de eritrócitos nos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,012) - São Paulo - 2009

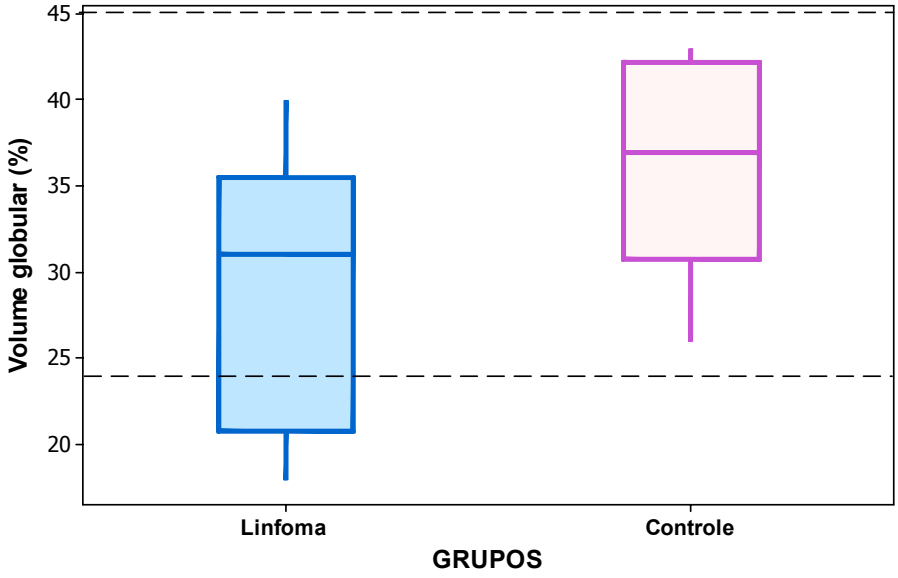

Figura 6 - Diagrama de blocos dos valores do volume globular dos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,012) - São Paulo - 2009

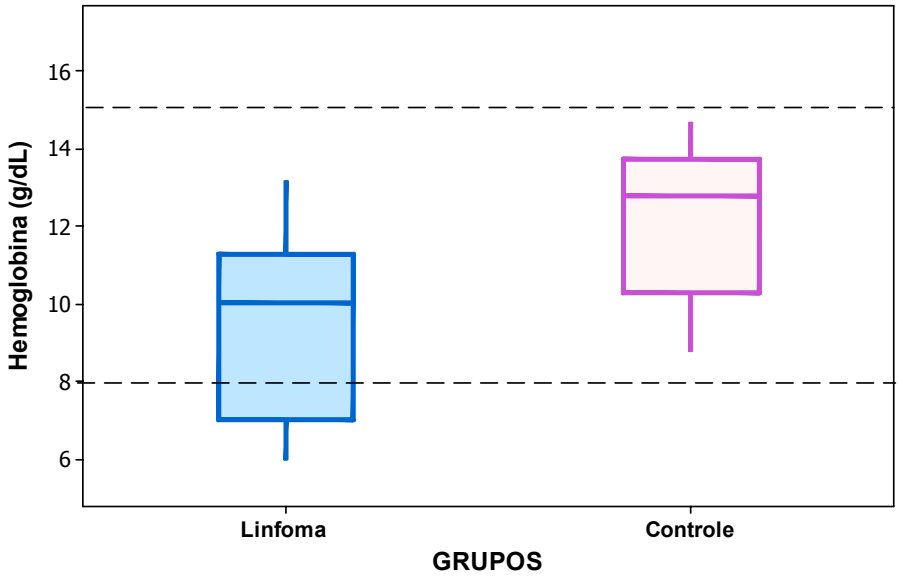

Figura 7 - Diagrama de blocos dos valores da hemoglobina dos animais dos grupos linfoma e controle (*p*=0,004) - São Paulo - 2009

A detecção do material genético de *Mycoplasma* spp, foi realizada por meio prova de PCR-Nested para todos os 28 animais do estudo. Somente um animal do grupo de felinos com linfoma foi identificado como infectado pelo *Mycoplasma* spp, e encontrava-se concomitantemente infectado pelo FeLV. A figura 8 ilustra o resultado obtido do produto da PCR-Nested na eletroforese em gel de agarose 1,5%.

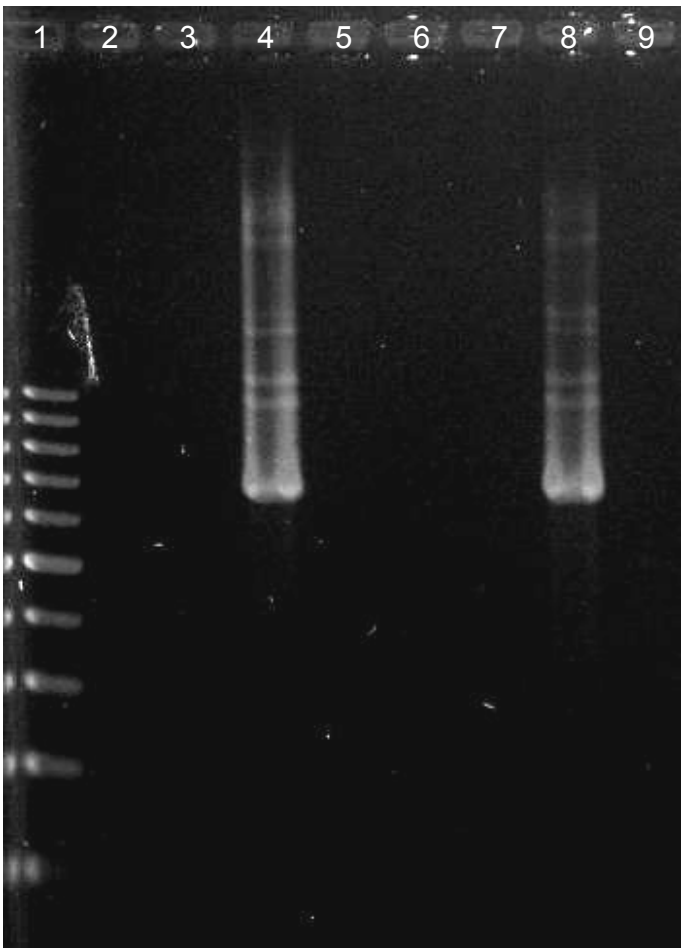

Figura 8 - Produtos da amplificaçao identificados pela fluorescência do brometo de etidio em gel de agarose 1,5%, onde 1 é o marcador de peso molecular (100pb), 2 e 3 amostras negativas, 4 amostra positiva, 5 controle negativo da PCR-Nested, 6 amostra negativa, 7 controle negativo da PCR, 8 controle positivo da PCR e 9 segundo controle negativo da PCR- Nested – São Paulo – 2009

Posteriormente, realizou-se a análise da seqüência de nucleotídeos desta amostra, pesquisou-se sua homologia considerando outras seqüências depositadas no GenBank, e confirmou-se que correspondia a *M. haemofelis*. Esta seqüência foi depositada no GenBank sob o numero de acesso FJ544859 (Anexo B) e teve uma identidade de 99% com respeito a muitas outras seqüências, como uma amostra da Itália (EU839978) (GENTILINI et al., 2008), a amostra descrita num paciente humano HIV positivo no Brasil (DOS SANTOS et al., 2008), algumas amostras descritas na USP por Hora (2008), amostras dos hemoplasma identificados em felideos silvestres ao redor do mundo (DQ825458, DQ825451) (WILLI et al., 2007b), entre outras que, como exemplo, encontram-se no anexo C.

Na análise individual dos animais que apresentaram anemia quando do diagnóstico de linfoma, dois animais (Midras e Negão) apresentaram anemia normocítica e normocrômica não regenerativa, sendo que o primeiro foi negativo no teste sorológico para pesquisa de FIV e FeLV e o segundo, positivo para FIV. Outros dois animais apresentaram anemia macrocítica normocrômica não regenerativa, sendo que um deles (Panda) apresentou resultado positivo na pesquisa de FeLV. O único animal positivo para *Mycoplasma haemofelis* não apresentava anemia (eritrócitos 7,8 x 10^6/mm^3 e volume globular 34%) quando diagnosticou-se o linfoma.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo a idade média dos animais com linfoma foi de 7,9 anos, concordando com os achados de Court; Watson e Peaston (1997) e Mello et al. (2007) (7,3 anos) e inferior ao verificado por Vail et al. (1998) (9,5 anos) e por Gabor, Malik e Canfield (1998)(10 anos).

A forma de apresentação mais freqüente da neoplasia foi a nodal, observada em 50% da população estudada, superior aos achados de Court, Watson e Person (1997), com 30% (n=18/60), Gabor, Malik e Canfiel (1998), com 16,9% (n=20/118), e Vail et al. (1998), com 18,8% (n=27/145). Segundo Jacobs, Messick e Valli (2002), a forma alimentar é atualmente a mais comumente encontrada em felinos. No estudo de Gabor, Malik e Canfield (1998), relatou-se uma prevalência de 51% (n=60/118). No presente trabalho, a forma alimentar foi observada em 35% dos animais, freqüência similar àquela descrita por Vail et al. (1998) de 34,7% (n=50/145) e Hadden et al. (2008) de 41% (n=25/61) e muito próxima daquela reportada por Mello et al. (2007), de 32,3%, em um estudo de casuística na própria cidade de São Paulo. Quanto ao linfoma extranodal, diagnosticado em 14,2% dos animais, esteve próximo da prevalência descrita por Vail et al. (1998) de 20% (n=29/145), e inferior aos relatos de Court, Watson e Person (1997) de 26,6% (n=16/60) e Gabor, Malik e Canfiel (1998), que encontraram uma prevalência de 45% (n=18/118).

As diferenças em relação à forma de apresentação da doença estão provavelmente relacionadas, entre outros fatores, à metodologia deste estudo, no qual os animais que já haviam recebido quaisquer tratamentos prévios não puderam ser incluídos no grupo experimental. Além disso, no período de desenvolvimento do estudo, vários animais com suspeita de linfoma foram diagnosticados com doença inflamatória intestinal. Sabe-se que uma linha tênue separa o diagnóstico de doença inflamatória intestinal em sua forma mais agressiva e o linfoma alimentar, fato que leva pesquisadores americanos e europeus a se reunirem em forças-tarefa, de modo a procurar estabelecer procotolos que tornem mais preciso o diagnóstico diferencial

dessas enfermidades. Associado a uma amostragem relativamente pequena, quando comparada a estudos internacionais, soma-se ainda o fato que, dada as características do linfoma em felinos, várias são as classificações descritas e nenhuma foi ainda considerada como padrão, o que leva a grande variabilidade e maior dificuldade de comparação dos estudos.

Com relação à infecção pelo FIV, a freqüência de 7,14% foi relativamente próxima daquela relatada nos Estados Unidos por Milner et al. (2005) de 6,4% (n=2/30), inferior a observada por Mello et al. (2007) de 17,6% (6/34) e muito diferente daquela descrita na Austrália de 36-46% (COURT; WATSON; PEASTON, 1997; GABOR et al., 2001). Essa diferença pode ser o reflexo de uma alta prevalência do FIV na população felina australiana em geral.

A freqüência da infecção pelo FeLV (21,42%) nos gatos com linfoma, foi similar à descrita por Vail et al. (1998) que observou 25,5% de animais positivos em 110 estudados, e elevada com relação aos estudos realizados na Austrália, nos quais Court, Watson e Peaston, (1997) relataram freqüência de 9% em 22 animais e Gabor et al. (2001) com 1,8% de positividade em 107 gatos. Em São Paulo, em um estudo desenvolvido por Reche, Hagiwara e Lucas (1997) no qual foram realizados testes sorológicos em 401 animais, 8% (n=32/401) deles foram positivos para o FeLV, dos quais 20% apresentaram linfoma, o que indica que a relação entre a infecção pelo FeLV e a ocorrência de linfoma se mantém.

Com relação à análise do eritrograma, observou-se que, em média, ocorreu uma redução nos valores da contagem global de eritrócitos, volume globular e concentração de hemoglobina nos animais com linfoma, quando comparados ao grupo controle, com diferença significativa. Anemia foi observada em 28,6% dos gatos com linfoma e, embora não existam trabalhos na literatura compulsada para efeitos de comparação com relação aos felinos, segundo Miller (2009) que pesquisou cães com linfoma, 32% dos animais apresentavam anemia no momento do diagnóstico, valores muito próximos aos encontrados neste estudo e um pouco inferiores aos de Abbo (2007) que, também trabalhando com cães, relatou 40% de ocorrência de anemia. Vale ressaltar que, além de ser a mais comum das síndromes paraneoplásicas, a

anemia tem um impacto negativo na qualidade de vida, progressão da doença e resposta ao tratamento por isso deve sempre ser avaliada em pacientes oncológicos.

Na análise individual dos quatro gatos anêmicos, dois apresentaram anemia normocítica normocrômica não regenerativa, que poderia ser decorrente das alterações associadas a doença crônica ou neoplásica, nas quais os principais mecanismos patológicos envolvidos são a indisponibilidade do ferro, devido ao seqüestro do íon nos macrófagos, redução do tempo médio de vida dos eritrócitos e a falha na medula óssea em aumentar a produção de eritrócitos para compensar a demanda (GABOR; CANFIELD; MALIK, 2000). Adicionalmente, um desses animais encontrava-se infectado pelo FIV e, além da anemia, apresentava elevações nos níveis séricos de uréia (317,6 mg/dL) e creatinina (2,5 mg/dL). Portanto, nesse caso, além da infecção pelo FIV, a anemia também poderia estar ocorrendo em conseqüência da doença renal crônica e provavelmente manifestando-se como uma somatória dos mecanismos patológicos.

Outros dois animais apresentaram anemia macrocítica normocrômica, igualmente de caráter não regenerativo. Dadas as características da anemia poderia se suspeitar da infecção pelo FeLV. Em um dos animais, o resultado do teste sorológico foi negativo. Esse animal também foi testado por imunofluorescência indireta, cujo resultado permaneceu negativo. Já o outro animal encontrava-se infectado pelo FeLV, o que justificaria a ocorrência de anemia macrocítica.

A pesquisa da infecção pelo FeLV é importante pois, além de seu envolvimento direto na ocorrência dos linfomas, na presença de infecção pelos micoplasmas, a anemia produzida pode ser mais intensa em decorrência da infecção retroviral concomitante (GRINDEM; CORBETT; TOMKINS, 1990; GEORGE et al., 2002). Assim, a micoplasmose hemotrópica, embora muitas vezes seja apenas considerada como um diagnóstico de suspeição na presença de anemias com características de regeneração, deve ser sempre considerada como um diagnóstico diferencial em todas os casos de anemias, sejam elas regenerativas ou não (KEWISH et al., 2004; HORA, 2008).

Neste estudo, apenas um animal com linfoma foi positivo na PCR-Nested para pesquisa de micoplasmas, perfazendo 7,14% dos animais. A seqüência genética encontrada, quando comparada com as depositadas no GenBank, apresentou 99% de identidade com o *M. haemofelis*. No grupo controle composto por animais sadios, nenhum animal foi positivo.

Considerando algumas variações que podem ocorrer na PCR (ex. *primers* diferentes ou diferentes metodologias), esta é uma técnica analitica sensível para a amplificação do DNA dos micoplasmas e que, em se usando *primers* espécie específicos, não amplifica outros microorganismos associados com bacteremia em gatos (JENSEN et al., 2001). Com o intuito de obter uma maior sensibilidade na PCR, utilizando técnicas combinadas de PCR em tempo real, Sykes et al. (2008b), concluíram que o uso da PCR convencional foi mais sensível (95%) na identificação dos diferentes micoplasmas quando comparado com a PCR em tempo real (76%). Assim, o uso de uma técnica convencional como a usada no presente trabalho pode ser mais útil e muito menos dispendiosa para diagnosticar a micoplasmose hemotropica felina na rotina clínica.

Utilizando a PCR, Batista (2004), na cidade de Botucatu – São Paulo, descreveu uma prevalência de 10,8% (n=8/74) de *M. haemofelis* em animais anêmicos. Hora (2008) em São Paulo relatou prevalência similar, sendo que em um grupo de 270 animais doentes (anêmicos) encontrou 23 animais infectados pelo *M. haemofelis*, portanto com prevalência de 8,5%. Em estudos internacionais, prevalências maiores de infecção pelo *M. haemofelis* foram encontradas, como nos Estados Unidos de 11 a 12% (JENSEN et al., 2001; ISHAK; RADECKI; LAPPIN, 2007), no Canadá de 40% (n=14/40) (KEWISH et al., 2004) e na Itália de 27,5% (n=11/40) (GENTILINI et al., 2008). Porém, também foram descritas prevalências menores como no Reino Unido de 1,6% (n=2/122) (TASKER et al., 2003a), na Suíça de 1,2% (n=9/713) (WILLI et al., 2006a), e mesmo nos Estados Unidos de 4,8% (n=15/310) (SYKES et al., 2008b), sempre considerando animais anêmicos.

Na literatura consultada existe apenas um relato de caso sobre o agravamento da anemia em um gato com linfoma após o início do tratamento quimioterápico, em

decorrência da infecção pelo *Candidatus* M. haemominutum e não por *M. haemofelis* (LORIMIER; MESSICK, 2004). Reynolds e Lappin (2007), em um estudo com 21 animais infectados pelo mesmo agente encontraram um animal apresentando linfoma, dentro dos que apresentavam algum tipo de doença concomitante com a infecção (8/21). Na tentativa de se avaliar as variáveis clinicas associadas à infecção pelo *Candidatus* M. hemominutum em 41 animais, Sykes et al. (2008b) descreveram que 10% deles apresentavam linfoma e que 22% tinham recebido recentemente algum tratamento quimioterápico, sem especificar o tipo de neoplasia pela que eram acometidos. Estes relatos poderiam corroborar o fato que as alterações imunológicas decorrentes do linfoma e o tratamento antineoplásico, podem produzir a reativação de infecções latentes (DOBSON, 1998), nestes casos o micoplasma.

Neste estudo, a freqüência de infecção pelo micoplasma nos animais com linfoma foi superior à observada no grupo controle, composto por animais sadios, no qual nenhum gato encontrava-se infectado por micoplasmas, mas não diferiu da freqüência observada em gatos doentes (anêmicos) descrita por Hora (2008). A inexistência de infecção nos felinos sadios concorda com as observações de Jensen et al. (2001), e Tasker e Lappin (2002) que afirmam que a infecção é raramente encontrada em gatos hígidos. Outras possibilidades seriam a baixa prevalência da infecção em nosso meio e ainda a procedência dos animais, sendo todos domiciliados, mantidos em boas condições de manejo e higiene, e por fim, o tamanho da amostragem. Apesar do menor número de animais, esses resultados concordam com aqueles descritos por Hora (2008), que estudando uma população de 53 gatos sadios, provenientes da cidade de São Paulo, também pela técnica de PCR, não encontrou nenhum animal positivo na pesquisa do agente.

Na região de Botucatu (São Paulo), Batista (2004) encontrou uma prevalência de 10% de micoplasmose hemotrópica em animais sadios, os quais eram mantidos igualmente domiciliados e em boas condições de manejo e higiene. Esta prevalência foi representada pela infecção por *M. haemofelis*, distribuída em 3,7% como agente único e 6,2% em coinfecção com o *M. haemominutum.* Prevalência similar a reportada por Macieira et al. (2007), que na cidade do Rio de Janeiro encontrou

11,7% (n=9/77) de infecção pelos micoplasmas hemotrópicos em animais sadios, sendo 6 desses animais positivos para *M. haemofelis*. É possível que algum fator relacionado a manejo dos animais, como por exemplo o acesso à rua e a infestação por pulgas possa contribuir para a diferença geográfica verificada.

Particularmente neste estudo, o único animal positivo, ainda que infectado pelo micoplasma e soropositivo ao FeLV, não apresentava anemia no momento do diagnóstico do linfoma, com valores do eritrograma considerados normais quando comparados com os valores de referência estabelecidos por Jain (1993). A ausência de anemia poderia estar relacionada ao descrito por Tasker e Lappin (2002), que afirmaram que, embora a anemia esteja presente em alguns animais infectados, nem todos os gatos acometidos pelos micoplasmas desenvolvem anemia, ou seja, resultados positivos nem sempre estão associados com doença clínica (JENSEN et al., 2001). Também Bauer et al. (2008) descreveram que o encontro do DNA dos micoplamas no sangue não representaria o estado da infecção dos animais, demonstrando que os gatos positivos podem estar atuando como portadores e, provavelmente, os sintomas da doença teriam se manifestado apenas na fase aguda da infecção. Entretanto, este animal apresenta-se coinfectado pelo FeLV e linfoma. Segundo Harrus (2002) a coinfecção com *M. haemofelis* e FeLV geralmente resulta em anemia com manifestações clínicas mais graves do que a infecção apenas pelo *M. haemofelis*, fato esse que poderia levar, associado ao linfoma e ao início do tratamento antineoplásico, à ocorrência de grave anemia. Portanto, este seria um animal que necessitaria de acompanhamento clínico constante.

Neste estudo, a freqüência da infecção por micoplasmas hemotrópicos nos gatos com linfoma não diferiu daquela observada em gatos com outras enfermidades ou apenas manifestando anemia, considerando a mesma região geográfica e, embora tenha sido maior que a observada nos animais sadios do grupo controle, há que se considerar o tamanho da amostragem. Pelas observações deste estudo, nos gatos com linfoma maior atenção continua sendo necessária com relação à infecção pelos retrovírus, particularmente o FeLV, que além de estar envolvido na ocorrência do linfoma, pode ter um papel direto no desencadeamento das anemias e ser um

importante fator imunossupressor na ocorrência de outras infecções, como a micoplasmose hemotrópica.

3 CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi realizado, concluiu-se que a anemia observada nos gatos com linfoma não foi ocasionada pela infecção por micoplasmas hemotrópicos, mas provavelmente em decorrência das alterações hematológicas promovidas pelo processo neoplásico, associadas ou não à infecção pelo FeLV. Portanto, a infecção pelos micoplasmas não apresentou um impacto direto na ocorrência de anemias em gatos com linfoma.

REFERÊNCIAS

ABBO, A. H.; LUCROY, M. D. Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 12, p. 1836-1842, 2007.

BATISTA, T. N. **Freqüência de infecção do *Mycoplsma haemofelis* e *'Candidatus Mycoplama haemominitum'* em gatos *(Felis catus)*.** 2004. 44 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinãria e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu, 2004.

BAUER, N.; BALZER, H.; THÜRE, S.; MORITZ, A. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery** ,v. 10, n. 3, p. 252-258, 2008.

BERGMAN, P. L. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen´s small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 77-93.

BERTONE, E.; SNYDER, L. A.; MOORE, A. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 3, p. 268-273, 2002.

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. Patologia clínica veterinária. **Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, p. 2-34, 1982.

BRIDGEFORD, E. C.; MARINI, R. P.; PARRY, N. M.; RICKMAN, B.; FOX, J. Gastric Helicobacter species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 106-113, 2008.

CLARK, R. *Eperythrozoon felis* (sp. Nov) in a cat. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 13, n. 1, p. 15-16, 1942.

COURT, E. A.; WATSON, A. D.; PEASTON, A. E. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 424-427, 1997.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europa: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 307-317, 2003.

DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum'

in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 4, p. 413-417, 2008.

DOBSON, J. Options for the use of chemotherapy in small animals Part 1. Anticancer drugs. **In Practice**, v. 20, n. 8, p. 403-413, 1998.

DOERS, K. L.; OLVER, C.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Use of enrofloxacin for treatment of large-form Haemobartonella felis in experimentally infected cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 2, p. 250-253, 2002.

DOS SANTOS, A. P.; DOS SANTOS, R. P.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; DE OLIVEIRA, S. T.; DE SÁ GUIMARAES, A. M.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H.; MESSICK, J. B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1922-1924, 2008.

FINORA, K. Common paraneoplastic syndromes. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 123-126, 2003.

FLINT, J. C.; MOSS, L. C. Infectious anemia in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 122, n. 45-48, 1953.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Reaseach** , v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998.

FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of '*Candidatus* Mycoplasma turicensis' infection in domestic cats in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, 2007.

GABOR, L. J.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. Haematological and biochemical finding in cats in Australia with lymphosarcoma. **Autralian Veterinary Journal**, v. 78, n. 7, p. 456-461, 2000.

GABOR, L. J.; LOVE, D. N.; MALIK, R.; CANFIELD, P. J. Feline immunodeficiency virus status of autralian cats with lymphosarcoma. **Autralian Veterinary Journal**, v. 79, n. 8, p. 540-545, 2001.

GABOR, L. J.; MALIK, R.; CANFIELD, P. J. Clinical and Anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats in Sydney. **Autralian Veterinary Journal**, v. 76, n. 725-732, p. 1998.

GENTILINI, F.; NOVACCO, M.; TURBA, M. E.; WILLI, B.; BACCI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2008. doi: 10.1016/j.jfms.2008.06.008. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6WJC-4TFDY6H-1-1&_cdi=6875&_user=5674939&_orig=search&_coverDate=09%2F14%2F2008&_sk=999999999&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkWb&md5=a2c6d9c94c8b27a57778075b6cfb5459&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 2 out. 2008.

GEORGE, J. W.; RIDEOUT, B. A.; GRIFFEY, S. M.; PEDERSEN, N. C. 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, n. 8, p. 1172-1178, 2002.

GRINDEM, C. B.; COBERTT, W. T.; TOMKINS, M. T. Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 1, p. 96-99, 1990.

HADDEN, A. G.; COTTER, S. M.; RAND, W.; MOORE, A. S.; MORRISSEY, P. Efficacy and toxicosis of VELCAP-C treatment of lymphoma in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 1, p. 153-157, 2008.

HARRUS, S.; KLEMENT, E.; AROCH, I.; STEIN, T.; BARK, E.; LAVY, E.; MAZAKI-TOVI, M.; BANETH, G. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **Veterinary Record**, v. 151, n. 3, p. 82-88, 2002.

HARTMANN, K.. Feline leukemia virus infection. In: GREENE C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 105-130.

HARVEY, J. W. Hemotrophic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 252-260.

HAYES, A. Feline lymphoma 1. Principles of diagnosis and management. **In Practice**, v. 28, n. 9, p. 516-52, 2006a.

HAYES, A. Feline lymphoma 2. Specific disease presentations. **In Practice**, v. 28, n. 10, p. 578-585, 2006b.

HIGGINS, M. A.; ROSSMEISL, J. H.; SAUNDERS, G. K.; KIUPEL, M. B-Cell lymphoma in the peripheral nerves of a cat. **Veterinary Pathology** , v. 45, n. 1, p. 54-57, 2008.

HORA, A. S. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. 75 f. Dissertalçao (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ISHAK, A. M.; DOWERS, K. L.; CAVANAUGH, M. T.; POWELL, C.; HAWLEY, J. R.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Marbofloxacin for the treatment of experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 288-292, 2008.

ISHAK, A. M.; RADECKI, S.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum', *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.

JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of the hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002, p. 119-198.

JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 19-53.

JENSEN, W.; LAPPIN, M. R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W. J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604-608, 2001.

JOHNSON, R. A.; ROODMAN, G. D. Hematologic manifestations of malignancy. **Disease-a-month : DM**, v. 35, n. 11, p. 721-768, 1989.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Apendix IX. In: _____. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 895-899.

KEWISH, K. E.; APPLEYARD, G. D.; MYERS, S. L.; KIDNEY, B. A.; JACKSON, M. L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 9, p. 749-752, 2004.

KOHN, B.; WEINGART, C.; ECKMANN, V.; OTTENJANN, M.; LEIBOLD, W. Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia in 19 cats: Diagnosis, Therapy, and Outcome (1998-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 159-166, 2006.

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

LITTLE, L.; PATEL, R.; GOLDSCHMIDT, M. Nasal and nasopharyngeal lymphoma in cats: 50 cases (1989-2005). **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p. 885-892, 2007.

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 75, n. 2, p. 94-99, 2004.

LORIMIER, L. P.; ALEXANDER, S. D.; FAN, T. M. T-cell lymphoma of the tympanic bulla in a feline leukemia virus-negative cat. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 12, p. 987-989, 2003.

LORIMIER, L. P.; MESSICK, J. B. Anemia associated with '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum' in a feline leukemia virus-negative cat with lymphoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 5, p. 423-427, 2004.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. C.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R.; MCLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro-Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 2, p. 120-129, 2007.

MADEWELL, B. R.; GIEGER, T. L.; PESAVENTO, P. A.; KENT, M. S. Vaccine site-associated sarcoma and malignant lymphoma in cats: a report of six cases (1997-2002). **Journal of the American Animal Hospital Association,** v. 40, n. 1, p. 47-50, 2004.

MARIONI-HENRY, K.; VAN WINKLE, T. J.; SMITH, S. H.; VITE, C. H. Tumors affecting the spinal cord or cats: 85 cases (1980-2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 2, p. 237-243, 2008.

MARKER, L.; MUNSON, L.; BASSON, P. A.; QUACKENBUSH, S. Multicentric T-cell lymphoma associated with Feline Leukemia Virus infection in a captive Namibian Cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 3, p. 690-693, 2003.

MELLO, C. W. S.; LUCAS, S. R. R.; RECHE JUNIOR, A.; FRANCHINI, M. L. Estudo retrospectivo de 34 casos de linfoma felino atendidos pelos serviços de clínica médica e pronto atendimento médico do HOVET-USP. In: CONGRESSO PAULISTA DE FELINOS, 2007, Guarujá. **Anais...** 2007. p. 49-52.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MESSICK, J.; BERENT, L. M.; COOPER, S. K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

MILNER, R. C.; PEYTON, J.; COOKE, K.; FOX, L. E.; GALLAGHER, A.; GORDON, P.; HESTER, J. Response rates and survival times for cats with lymphoma treated with the University of Wisconsin-Madison chemotherapy protocol: 38 cases (1996-

2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 7, p. 1118-1122, 2005.

MILLER, A. G.; MORLEY, P. S.; RAO, S.; AVERY, A. C.; LANA, S. E.; OLVER, C. S; Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** *,* v. 23, n. 1, p. 116-122, 2009.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some membres of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of '*Candidatus* Mycoplasma haemofelis', '*Candidatus* Mycoplasma haemomuris', '*Candidatus* Mycoplasma haemosuis' and '*Candidatus* Mycoplasma haemosuis' and '*Candidatus* Mycoplasma weyonii'. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891-899, 2001.

PETERS, I. R.; HELPS, C.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostic service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 142-150, 2008.

RECHE JUNIOR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 34, n. 3, p. 152-155, 1997.

REYNOLDS, C. A.; LAPPIN, M. R. "Candidatus Mycoplasma haemominutum" infections in 21 client-owned cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 43, n. 5, p. 249-257, 2007.

SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat.** St. Louis: Saunders Elselvier,2006. p. 131-143.

SHELTON, G.; LINENBERGER, M.; GRANT, C. K.; ABKOWITZ, J. Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 76, n. 6, p. 1104-1109, 1990.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). ***The* Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 4, p. 773-789, 2003.

SYKES, J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine** *,* v. 21, n. 4, p. 685-693; 2007.

SYKES, J. E.; OWENS, S. D.; TERRY, J. C.; LINDSAY, L. L.; PUSTERLA, N. Use of dried blood smears for detection of feline hemoplasmas using real-time polymerase

chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 5, p. 616-620. 2008a.

SYKES, J. E.; TERRY, J. C.; LINDSAY, L. L.; OWENS, S. D. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 372-379, 2008b.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In practice**, v. 28, n. 1, p. 136-141, 2006a.

TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS, C. R.; JENSEN, W. A.; OLIVER, C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to asess the prevalence and riks factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kindom. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 7, p. 193-198, 2003a.

TASKER, S.; BRADDOCK, J. A.; BARAL, R.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFRYDD-JONES, T. J.; MALIK, R. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 6, p. 345-354, 2004.

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLESS, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on Mycoplasma haemofelis infection. **Veterinary microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 169-179, 2006b.

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Use of Real-Time PCR to detect and quantify *Micoplasma haemofelis* and "*Candidatus* Mycoplasma haemominutum" DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 439-441, 2003b.

TASKER, S.; LAPPIN, M. S. *Haemobartonella felis*: recent development in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery** , v. 4, n. 1, p. 3-11, 2002.

TROXEL, M. T.; VITE, C. H.; VAN WINKLE, T. J.; NEWTON, A. L.; TICHES, D.; DAYRELL-HART, B.; KAPATKIN, A. S.; SHOFER, F. S.; STEINBERG, S. A. Feline intracranial neoplasia: Retrospective review of 160 cases (1985-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 850-859, 2003.

TSATSANIS, C.; FULTON, R.; NISHIGAKI, K.; TSUJIMOTO, H.; LEVY, L.; TERRY, A.; SPANDIDOS, D.; ONIONS, D.; MEIL, J. C. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. **Journal of Virology**, v. 68, n. 12, p. 8296-8303, 1994.

TWOMEY, L. N.; ALLEMAN, A. R. Cytodiagnosis of feline lymphoma. **Compendium on Continuing Education for the Practicin Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 17-32, 2005.

VAIL, D. M. Feline lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen´s small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 733-756.

VAIL, D. M.; MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and ther association with prognosis in 90 cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 349-354, 1998.

VAIL, D.M.; YOUNG, K. Hemopoietic Tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen´s small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 699-784

VANSTEENHOUSE, J. L.; TABOADA, J.; MILLARD, J. R. Feline Hemobartonellosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 15, n. 4, p. 535-545, 1993.

WATANABE, M.; HISASUE, M.; SOUMA, T.; OHSHIRO, S.; YAMADA, T.; TSUCHIYA, R. Molecular Detection of *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum' Infection in Cats by Direct PCR Using Whole Blood without DNA Extraction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 10, p. 1095-1099, 2008.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HORMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 961-969, 2006a.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anaemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, 2005.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; TASKER, S.; MELI, M. L.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; HOFMANN-LEHMANN, R. From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods privide new insights. **Veterinary Microbiology,** v. 125 n. 3-4, p. 197-209, 2007a.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORRI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORQUIS, M. P. LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma

infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, 2007b.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F. S.; DOHERR, M. G.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of "*Candidatus* Mycoplasma turicensis" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 4430-4435, 2006b.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; HAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus* Mycoplasma haemominutum and *Mycoplasma haemofelis* by Ctenocephalides felis to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, 2005.

WOODS, J. E.; WISNEWSKI, J. E.; LAPPIN, M. R. Attempted transmission of *Candidatus* Mycoplasma haemominutum and *Mycoplasma* haemofelis by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p. 494-497, 2006.

YU, D-H.; KIM, H-W.; DESAI, A. R.; HAN, I-A.; LI, Y-H.; LEE, M-J.; KIM, I-S.; CHAE, J-S.; PARK, J. Molecular detection of feline hemoplasmas in feral cats in Korea. **Journal of veterinary medical science**, v. 69, n. 12, p. 1299-1301, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Valores relativos aos hemogramas dos felinos com linfoma no momento do diagnóstico - São Paulo - 2009

Animal	HEMOGRAMA													
	Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	Volume Globular (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos (mm^3)	Neutrófilos (mm^3)	Eosinófilos (mm^3)	Basófilos (mm^3)	Linfócitos Típicos (mm^3)	Linfócitos Atípicos (mm^3)	Monócitos (mm^3)	Plaquetas (mm^3)
BANKUSHINZA	8,0	37	13,0	46,25	16,25	35,14	23000	18860	460	0	2990	0	690	262000
HENRIQUE	7,8	34	10,7	43,6	13,7	31,5	8200	5084	492	0	2542	0	821	-
KIKA	8,3	39	11,8	46,99	14,22	30,26	19200	14016	1536	0	2880	0	768	555000
KUK	5,6	24	8,1	42,86	14,46	33,75	19300	18914	0	0	193	0	193	492000
MIDRAS	4,3 £	19	6,8	44,19	15,81	35,79	42000	32760	0	0	7140	1680	420	412000
MINIE	7,6	34	10,6	45	13,9	30,9	21800	16568	1962	0	2834	0	436	526000
MIU	5,3	27	8,2	52	15,3	29,7	10400	9568	312	0	520	0	0	621000
NEGÃO	4,7 £	20	7,1	42,55	15,11	35,5	37200	36828	0	0	372	0	0	60000
OLIVER	7,3	35	11,1	47,6	15,1	31,7	9000	6660	0	0	1980	0	360	-
PANDA	3,0 £	18	6,0	60	20	33,33	3800	152	0	0	3344	304	0	306000
RANY	7,5	34	10,9	45,33	14,53	32,06	6900	6141	0	0	621	0	138	307000
RIQUEZA	3,6 £	21	6,3	58,33	17,5	30	15600	5616	156	0	9672	0	156	150000
TAMY	10,4	40	13,2	38,46	12,69	33	8700	6438	0	0	1566	0	696	323000
TIMINHA	5,9	28	9,5	47,46	16,1	33,93	26600	23674	1330	0	0	0	1596	211000
Referência*	5,0-10,0	24-45	8,0-15,0	39,0-55,0	12,5-17,5	30,0-36,0	5500-19500	2500-12500	0-1500	raros	1500-7000	0	0-850	$3\text{-}8x10^5$

£ Reticulócitos raros.

- Determinações não realizadas (* Jain, 1993)

APÊNDICE B - Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo - 2009

Animal	HEMOGRAMA													
	Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	Volume Globular (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos (mm^3)	Neutrófilos (mm^3)	Eosinófilos (mm^3)	Basófilos (mm^3)	Linfócitos Típicos (mm^3)	Linfócitos Atípicos (mm^3)	Monócitos (mm^3)	Plaquetas (mm^3)
CARMLITA	8,8	40	13,3	45,45	15,11	33,25	9400	6486	188	0	2162	0	564	350000
COTONETE	9,8	37	11,6	37,76	11,84	31,35	12000	6960	480	0	4080	0	480	586000
GATARINA	9,5	43	13,4	45,26	14,11	31,16	6800	3672	544	0	2176	0	408	521000
JACK	9,8	43	13,5	43,88	13,78	31,4	7500	3675	1125	75	2250	0	375	356000
MAX	5,9	30	10,4	50,85	17,63	34,67	13200	5544	1716	528	5148	0	264	384000
PALOMA	6,5	26	8,8	40	13,54	33,85	14300	10296	715	0	3146	0	143	417000
PAMELA	6,1	31	9,4	50,82	15,41	30,32	24600	18450	1230	0	4182	0	738	277000
PANTERA	8,3	36	12,8	43,37	15,42	35,56	20500	15990	615	0	3280	0	615	294000
PINA	8,5	42	14,5	49,41	17,06	34,52	9100	3822	182	0	5005	0	91	258000
TOGINHA	10,6	43	14,7	40,57	13,87	34,19	7400	3552	666	0	3108	0	74	358000
PRISCILA	6,7	29	10,0	43,28	14,93	34,48	7200	3168	360	72	3384	0	216	426000
SAFIRA	10,7	42	14,6	39,25	13,64	34,76	10400	3744	624	312	5616	0	104	358000
SOFIA	8,3	37	12,8	44,58	15,42	34,59	10600	6148	742	106	3392	0	212	321000
TIGRÃO	6,7	31	10,6	46,27	15,82	34,19	19700	12608	1970	0	4925	0	197	390000
Referência*	5,0-10,0	24-45	8,0-15,0	39,0-55,0	12,5-17,5	30,0-36,0	5500-19500	2500-12500	0-1500	raros	1500-7000	0	0-850	$3\text{-}8x10^5$

* Jain, 1993.

APÊNDICE C- Determinações relativas à avaliação renal e hepática dos felinos com linfoma no momento do diagnóstico - São Paulo - 2009

Animal	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)
BANKUSHINZA	40,4	1,4	8,2	3,3	14,4	14,2	11,6	0	-	-	-
HENRIQUE	37,6	0,8	7,8	3,3	21,4	19,3	7,79	1,97	-	-	-
KIKA	22,8	1,2	7,2	3	22,3	73,7	24	2,35	-	-	-
KUK	84,8	1,2	5,2	1,4	13,97	9	7,28	0	-	-	-
MIDRAS	152,8	1,2	6	3,2	60,4	50,4	25,7	1,17	1,04	0,36	0,68
MINIE	65,8	1,1	6,4	2,6	57,5	165,8	65,4	1,8	0,29	0,12	0,17
MIU	62,2	1	5,6	2,5	8	71,5	55,2	0,46	-	-	-
NEGÃO	317,6	2,5	5	2,2	26,2	21,3	15,5	2,51	-	-	-
OLIVER	62,2	1,5	7	1,8	- -	39,8	36,2	- -	-	-	-
PANDA	86	1,1	7,4	3,1	48,4	52,4	52	1,7	-	-	-
RANY	37,7	1,2	7,8	3,5	30,4	38,4	11,5	0	-	-	-
RIQUEZA	64,4	1,1	7,8	3,2	27,9	60,8	10,6	0	0,53	0,33	0,2
TAMY	44,6	1,8	8,2	3,6	23,6	16,7	11,2	1,15	-	-	-
TIMINHA	73,2	0,9	7	2,4	13,1	14,4	7,5	2,7	-	-	-
Referência*	20-30	0,79-1,79	5,4-7,8	2,1-3.3	26-43	6-83	25-93	1,3-5,1	0,15-0,50		

- - Determinações não realizadas.
- Determinações não realizadas: soro não ictérico.
* Keneko, et. al. 1997.

APÊNDICE D - Determinações relativas à avaliação renal e hepática dos felinos do grupo controle - São Paulo - 2009

Animal	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)
CARMLITA	66,94	1,07	7,1	3,1	12,3	32,3	21	0	-	-	-
COTONETE	47,4	1,2	7,3	3,6	16,6	39,5	24,8	1,29	-	-	-
GATARINA	44	1,3	7,7	3,4	18,9	43,2	11,8	2,8	-	-	-
JACK	42	1,6	6,9	3,2	19,2	51,5	7,7	2,97	-	-	-
MAX	51,2	1,6	7,6	3,3	15,5	37,9	16,5	0	-	-	-
PALOMA	47,4	1,3	7,7	3,3	19,9	43,2	30,5	0,46	-	-	-
PAMELA	42,5	0,62	7,2	2,9	13	31,5	28,2	0,79	-	-	-
PANTERA	54,4	1,1	6,8	3,4	19,8	55,1	43,2	0,44	-	-	-
PINA	62,9	1,5	7,6	2,9	12,9	27,1	12,2	0,58	-	-	-
TOGINHA	62,7	1,6	7,3	3,1	17,3	35,6	18,6	0,17	-	-	-
PRISCILA	47,5	1,45	6,7	3	18	35,7	14	0,31	-	-	-
SAFIRA	47,7	1,15	7,2	3,8	16,8	36	31,2	1	-	-	-
SOFIA	70,2	1,6	6,9	3,4	19,9	58,9	27,5	0,45	-	-	-
TIGRÃO	61,3	1,2	7,2	3	14,6	30,8	9,5	1,3	-	-	-
Referência*	20-30	0,79-1,79	5,4-7,8	2,1-3.3	26-43	6-83	25-93	1,3-5,1	0,15-0,50		

- Determinações não realizadas: soro não ictérico.
* Keneko, et. al. 1997.

ANEXOS

ANEXO A – Seqüência de nucleotídeos referente à amostra positiva para o *M. haemofelis* utilizada como controle positivo para as reações da PCR e disponível no GenBank

NCBI Nucleotide

PubMed | Nucleotide | Protein | Genome | Structure

Search Nucleotide for Go Clear

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: EU442639. Reports Mycoplasma haemof...[gi:168258691]

Features Sequence

```
LOCUS       EU442639                1207 bp    DNA     linear   BCT 26-FEB-2008
DEFINITION  Mycoplasma haemofelis strain USP-24 16S ribosomal RNA gene, partial
            sequence.
ACCESSION   EU442639
VERSION     EU442639.1  GI:168258691
KEYWORDS    .
SOURCE      Mycoplasma haemofelis
  ORGANISM  Mycoplasma haemofelis
            Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1207)
  AUTHORS   Hora,A.S., Brandao,P.E. and Hagiwara,M.K.
  TITLE     Candidatus Mycoplasma turicensis infection in domestic cat in
            Brazil - first description
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1207)
  AUTHORS   Hora,A.S., Brandao,P.E. and Hagiwara,M.K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (02-FEB-2008) Medical Clinics, Faculty of Veterinary
            Medicine and Zootechny, University of Sao Paulo, Av. Orlando
            Marques Paiva 87, Sao Paulo 05508-270, Brazil
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1207
                     /organism="Mycoplasma haemofelis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="USP-24"
                     /host="Felis catus"
                     /db_xref="taxon:29501"
                     /country="Brazil"
                     /collection_date="2007"
     rRNA            <1..>1207
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgcccctctg tgggggatag ccgcttgaaa aagcgattaa taccccatag gaagctttat
       61 ccatgattta gcttttaaag ccttcgggtg ctgagggatt gggatatgct ctattagcta
      121 gttggcggga taaaagccca ccaaggcaat gatagatagc tggtcttaga ggatgaacag
      181 ccacaatggg attgagatac ggcccatatt cctacgggaa gcagcagtag ggaatcttcc
      241 acaatggacg aaagtctgat ggagcaatac catgtgaacg atgaaggcct ttttggttgt
      301 aaagttcttt tacgagggat aattatgata gtacttcgtg aataagtgac agcaaactat
      361 gtgccagcag ctgcggtaat acataggtcg cgagcattat tcggatttat tgggcgtaaa
      421 gcaagcgcag gcggatgtgt aagttctgtg ttaaatgcag ctactcaata gttgtatgca
      481 ccgaatacta catgtctaga ttgtggtagg gagtttcgga attaagcatg gagcggtgga
      541 atgtgtagat atgcttaaga acaccagagg cgaaggcgga aacttaggcc ataaatgacg
      601 cttaggcttg aaaagtgtgg ggagcaaatg ggattagata ccccagtagt ccacaccgta
      661 aacgatgggt attagatatt agggctttag ctttagtgtt gtagcttacg cgttaaatac
      721 cccgcctggg tagtacatat gcaaatatga aactcaaagg aattgacggg gacctgaaca
      781 agtggtggag catgttgctt aattcgataa tacacgaaaa accttaccaa ggtttgacat
      841 ccctcgcaaa gctatagaaa tatagtagag gttatcgagg tgacaggtgg tgcatggctg
      901 tcgtcagctc gtgtcttgag atgtttggtt aagtcccgca acgagcgcaa ccccactctt
      961 tagttacttg ttctaaagag actgcacagt aatgtagagg aaggatggga tcacgtcaag
     1021 tcatcatgcc ccttatgcct tgggctgcaa acgtgctaca atggcgaaca caatgtgttg
     1081 caaaccagcg atggtaagct aatcaccaaa tttcgtctca gttcggatag gaggctgcaa
     1141 ttcgcctcct tgaagttgga atcactagta atcccgtgtc agctatatcg gggtgaatcc
     1201 gttccca
```

Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=168258691

ANEXO B - Seqüência de nucleotídeos referente à amostra positiva para o *M. haemofelis* obtida em um gato com linfoma mediante as reações da PCR e disponível no GenBank

NCBI Entrez Nucleotide

PubMed | Nucleotide | Protein | Genome | Structure

Search Nucleotide for Go Clear

Display GenBank Show 5 Send to Hide: sequence all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: FJ544859. Reports Mycoplasma haemof...[gi:220966730]

Features Sequence

```
LOCUS       FJ544859                 519 bp    DNA     linear   BCT 21-JAN-2009
DEFINITION  Mycoplasma haemofelis strain USP-210808 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   FJ544859
VERSION     FJ544859.1  GI:220966730
KEYWORDS    .
SOURCE      Mycoplasma haemofelis
  ORGANISM  Mycoplasma haemofelis
            Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.
REFERENCE   1  (bases 1 to 519)
  AUTHORS   Garcia-Leal,M.L., Brandao,P.E. and Lucas,S.R.R.
  TITLE     Evaluation of mycoplasma-associated lymphomas in cats
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 519)
  AUTHORS   Garcia-Leal,M.L., Brandao,P.E. and Lucas,S.R.R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-DEC-2008) Department of Clinics, College of
            Veterinary Medicine, University of Sao Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando
            M Paiva 87, Sao Paulo, SP 05508-270, Brazil
 FEATURES             Location/Qualifiers
      source          1..519
                      /organism="Mycoplasma haemofelis"
                      /mol_type="genomic DNA"
                      /strain="USP-210808"
                      /host="Felis catus"
                      /db_xref="taxon:29501"
                      /country="Brazil"
      rRNA            <1..>519
                      /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
        1 ttgtaaagtt cttttacgag ggataattat gatagtactt cgtgaataag tgacagcaaa
       61 ctatgtgcca gcagctgcgg taatacatag gtcgcgagca ttattcggat ttattgggcg
      121 taaagcaagc gcaggcggat gtgtaagttc tgtgttaaat gcagctactc aatagttgta
      181 tgcaccgaat actacatgtc tagattgtgg tagggagttt cggaattaag catggagcgg
      241 tggaatgtgt agatatgctt aagaacacca gaggcgaagg cggaaactta ggccataaat
      301 gacgcttagg cttgaaagtg tggggagcaa atgggattag ataccccagt agtccacacc
      361 gtaaacgatg ggtattagat attagggctt tagctttagt gttgtagctt acgaattaaa
      421 taccccgcct gggtagtaca tatgcaaata tgaaactcaa aggaattgac ggggacctga
      481 acaagtggtg gagcatgttg cttaattcga taatacacg
//
```

Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=220966730

ANEXO C - Exemplo de algumas das seqüências do *M. haemofelis* depositadas no GenBank, com as quais a seqüências obtida no presente estudo teve uma identidade de 99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ544859.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-210808 16S ribosomal RNA gene,	937	937	100%	0.0	100%
EU839978.1	Mycoplasma haemofelis strain IT140 16S ribosomal RNA gene, partia	928	928	100%	0.0	99%
EU888930.1	Uncultured Mycoplasma sp. clone Mh.1-BR 16S ribosomal RNA, partia	928	928	100%	0.0	99%
EU442638.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-23 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442633.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-18 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442630.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-15 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442627.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-12 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442624.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-09 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442622.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-07 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442621.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-06 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442620.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-05 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442619.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-04 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442618.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-03 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
EU442616.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-01 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
DQ825458.1	Mycoplasma haemofelis isolate 574 16S ribosomal RNA gene, partial	928	928	100%	0.0	99%
DQ825451.1	Mycoplasma haemofelis isolate 94-74 16S ribosomal RNA gene, parti	928	928	100%	0.0	99%
AY150985.1	Mycoplasma haemofelis isolate UK no. 6 16S ribosomal RNA gene, pa	928	928	100%	0.0	99%
AY150977.1	Mycoplasma haemofelis isolate Australian no. 2 16S ribosomal RNA g	928	928	100%	0.0	99%
AY150976.1	Mycoplasma haemofelis isolate Australian no. 1 16S ribosomal RNA g	928	928	100%	0.0	99%
DQ157160.1	Mycoplasma haemofelis clone 379939.4 16S ribosomal RNA gene, pa	928	928	100%	0.0	99%
DQ157159.1	Mycoplasma haemofelis clone 404526.4 16S ribosomal RNA gene, pa	928	928	100%	0.0	99%
DQ157158.1	Mycoplasma haemofelis clone 404526.2 16S ribosomal RNA gene, pa	928	928	100%	0.0	99%
DQ157157.1	Mycoplasma haemofelis clone 379939.2 16S ribosomal RNA gene, pa	928	928	100%	0.0	99%
DQ157156.1	Mycoplasma haemofelis from cat 1089 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
DQ157155.1	Mycoplasma haemofelis from cat 1015 16S ribosomal RNA gene, part	928	928	100%	0.0	99%
AY069948.1	Haemobartonella felis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	928	928	100%	0.0	99%
AF178677.1	Haemobartonella felis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	928	928	100%	0.0	99%
EU442635.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-20 16S ribosomal RNA gene, part	926	926	99%	0.0	99%
EU442617.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-02 16S ribosomal RNA gene, part	924	924	99%	0.0	99%
DQ825453.1	Mycoplasma haemofelis isolate 94-122 16S ribosomal RNA gene, par	924	924	100%	0.0	99%
EU930823.1	Mycoplasma haemofelis isolate Porto Alegre 16S ribosomal RNA gene	922	922	100%	0.0	99%
EU442634.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-19 16S ribosomal RNA gene, part	922	922	100%	0.0	99%
EU442632.1	Mycoplasma haemofelis strain USP-17 16S ribosomal RNA gene, part	922	922	100%	0.0	99%