

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**LINFOMA EM GATOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA  
(FELV) NO SUL DO BRASIL: ASPECTOS PATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR**

**PAULA REIS RIBEIRO**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**LINFOMA EM GATOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA  
(FELV) NO SUL DO BRASIL: ASPECTOS PATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR**

**Autor: Paula Reis Ribeiro**

**Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutora em Ciências  
Veterinárias na área de Patologia Animal e  
Patologia Clínica**

**Orientador: Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini**

**PORTO ALEGRE  
2024**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro, Paula Reis

Linfoma em gatos infectados pelo vírus da leucemia felina (FeLV) no Sul do Brasil: aspectos patológicos e caracterização molecular / Paula Reis Ribeiro. -- 2024.

80 f.

Orientador: Saulo Petinatti Pavarini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Vírus da leucemia felina. 2. Linfoma. 3. Felinos. 4. Transcriptoma. I. Pavarini, Saulo Petinatti, orient. II. Título.

PAULA REIS RIBEIRO

LINFOMA EM GATOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV)  
NO SUL DO BRASIL: ASPECTOS PATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO  
MOLECULAR

Aprovada em 12 SET 2024

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Profa. Dra. Renata Assis Casagrande  
Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Roselene Ecco  
Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Luciana Sonne  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, em especial aos meus pais, Regina e Newton, e à minha irmã Fernanda, por serem minha base, onde eu sempre encontrei refúgio, apoio e amor incondicionais. Obrigada por cada conselho, incentivo, e por sempre acreditaram em mim. Sem vocês, nada disso seria possível.

Um agradecimento especial ao meu cunhado, Gustavo, que se tornou uma parte essencial da nossa família, sempre disposto a me aconselhar e ajudar, sendo mais uma fonte de apoio.

Aos meus sobrinhos, Laura, Alice e Gabriel, que, desde que chegaram para completar nossa família, se tornaram meus grandes amores e uma motivação constante para eu seguir em frente, meu imenso carinho.

Agradeço também aos meus tios Toninho e Ricardo, que sempre demonstraram grande carinho e zelo, acompanhando minha trajetória, torcendo por mim e sendo exemplos de integridade.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos, a família que eu escolhi, que foram essenciais ao longo dessa caminhada. Guardo com muito carinho todo o amor e apoio compartilhados. Gostaria de agradecer em especial aos amigos que fiz em Porto Alegre: Emanoelly, Vanessa, Joanna, Derek, Lauren e Alexandra. E também aos meus amigos de longa data, Luísa, Júlia e Fernanda, que, mesmo distantes, estiveram sempre presentes.

Aos professores Saulo Pavarini, David Driemeier, Luciana Sonne e Welden Panziera, minha gratidão pela orientação, dedicação e conhecimento transmitido ao longo desses anos. Agradeço também à Marcele pelos inúmeros ensinamentos e à Bárbara por todo auxílio e amizade.

Agradeço ao professor Mariano Carossino pela orientação e apoio nas tentativas de realizar o doutorado no exterior. Sou imensamente grata pelo investimento, por acreditar no meu potencial, e pelos valiosos ensinamentos transmitidos. Minha gratidão também se estende a toda equipe e aos professores do PBS e LADDL da LSU, pelos diversos aprendizados desse período.

Por fim, agradeço aos meus colegas de trabalho da UFRGS e da LSU pelos conhecimentos compartilhados e por toda a ajuda.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para essa jornada, meu mais sincero e profundo obrigado.

## RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *Gammaretrovirus* que acomete felinos, os quais desenvolvem uma grande variedade de doenças, incluindo linfoma. A prevalência de infecção por FeLV ainda é alta no Brasil e reforça a importância desse objeto de estudo. Este trabalho buscou caracterizar determinados tipos de linfoma em gatos infectados por FeLV. A tese é composta por três artigos científicos. O primeiro manuscrito teve o objetivo de descrever dois casos de linfoma difuso de grandes células B em terceira pálpebra de gatos infectados pelo FeLV. Dois felinos apresentaram aumento de volume e massa unilateral em terceira pálpebra, as quais eram caracterizadas por proliferação neoplásica de linfócitos B grandes e que exibiam imunomarcção para antígeno gp70 de FeLV. Esse primeiro manuscrito demonstra a importância da inclusão do linfoma como um diagnóstico diferencial de neoformações em terceira pálpebra de gatos, principalmente naqueles infectados por FeLV. O segundo artigo teve como objetivo fazer caracterização anatomopatológica de 32 linfomas que acometiam o sistema digestivo de gatos FeLV-positivos e submetidos à necropsia. Vinte e três casos afetaram o intestino delgado, seguido do intestino grosso (19/32) e estômago (18/32). Espessamento segmentar da parede intestinal e/ou gástrica foi mais comumente observado (23/32), seguido de formações nodulares (16/32). Os linfócitos neoplásicos eram predominantemente grandes e intermediários, de imunofenótipo B e classificados como linfoma difuso de grandes células B. Linfoma envolvendo o sistema digestivo também é observado em gatos infectados por FeLV e em sua maior parte eram multicêntricos, de linfócitos B intermediários a grandes, sendo improvável o diagnóstico de linfoma de pequenas células T baixo grau. O terceiro artigo teve como objetivo descrever as características patológicas e moleculares de linfomas tímicos de célula T induzidos por FeLV. Foi demonstrado por meio da hibridização *in situ* tropismo disseminado de FeLV por diversos tipos celulares, alguns ainda não previamente descritos, e incluíram células linfoides, hematopoiéticas, epiteliais e mesenquimais. No sequenciamento de RNA, 536 genes diferencialmente expressos foram detectados e estavam predominantemente envolvidos com processamento de rRNA, biogênese de ribossomos, ciclo celular e reparo de DNA. O mecanismo mais provável de indução tumoral foi por mutagênese insercional no *locus flvi-2*, baseado no aumento da expressão do gene *BMI1*. FeLV é um vírus altamente prevalente e relevante em diversos países, e mais estudos devem ser realizados para compreender doenças causadas pelo FeLV, além de desvendar o papel de diferentes células na patogênese e transmissão do FeLV, além de descrever o transcriptoma de outras formas anatômicas de linfoma causados pelo FeLV.

**Palavras-chave:** Felino. Hibridização *in situ*. Linfoma. Retrovírus. Transcriptoma.

## ABSTRACT

*Feline leukemia virus (FeLV) is a Gammaretrovirus that affects cats worldwide, which develop a wide range of diseases, including lymphoma. The prevalence of FeLV infection is high in Brazil, reinforcing the relevance of this study object. This study aimed to characterize certain types of lymphoma in FeLV-infected cats. This dissertation comprises three scientific manuscripts. The first manuscript aimed to describe two cases of large B-cell lymphoma affecting the third eyelid in FeLV-infected cats. Two cats presented with unilateral enlargement and mass in the third eyelid, which were characterized by a neoplastic proliferation of large B lymphocytes that showed immunolabeling for anti-FeLV gp70. This manuscript demonstrates that lymphoma should be considered an important differential in tumoral lesions affecting the third eyelid of cats, especially those infected with FeLV. The second manuscript aimed to perform a pathological characterization of 32 lymphomas affecting the alimentary tract of necropsied and FeLV-infected cats. Twenty-three cases affected the small intestine, followed by the large intestine (19/32) and stomach (18/32). Segmental thickening of intestinal and/or gastric wall was commonly observed (23/32), followed by nodules (16/32). The neoplastic lymphocytes were predominantly large and intermediate, with B-cell immunophenotype and classified as diffuse large B-cell lymphoma. Lymphoma involving the alimentary tract is also observed in FeLV-infected cats and it was mostly multicentric, of intermediate to large B-cells, being unlikely the diagnosis of low-grade small T-cell lymphoma. The third manuscript aimed to describe the pathological and molecular features of FeLV-induced T-cell thymic lymphomas. There was FeLV widespread cell tropism by in situ hybridization, and a wide range of affected cell types was observed, of which many have not been previously described for FeLV, and included lymphoid, hematopoietic, epithelial and mesenchymal cells. RNA sequencing results showed 536 differentially expressed genes, mostly involved in rRNA processing, ribosome biogenesis, cell cycle and DNA repair. The most likely mechanism of tumor induction was insertional mutagenesis in flvi-2 locus, based on upregulation of BMII gene. FeLV is still a highly prevalent and relevant virus in several countries, and more studies should be performed to better understand the diseases caused by virus, as well as to determine the role of different cell types in FeLV pathogenesis and transmission and to describe the transcriptome and clarify the differences in gene expression in other FeLV-induced types of lymphoma.*

*Keywords: Feline. In situ hybridization. Lymphoma. Retrovirus. Transcriptome.*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 ARTIGO 1.....</b>	<b>13</b>
<b>3 ARTIGO 2.....</b>	<b>15</b>
<b>4 ARTIGO 3.....</b>	<b>18</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>22</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um agente infeccioso relevante que acomete felinos e possui distribuição mundial (Hartmann, 2011; Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020; Little *et al.*, 2020). Trata-se de um retrovírus que causa infecções persistentes por toda a vida do animal e está associado ao desenvolvimento de uma ampla variedade de doenças e lesões, as quais incluem neoplasias, anemias e imunodeficiências (Biezus *et al.*, 2023a; de Mello *et al.*, 2023; Hartmann, 2011; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023). O FeLV é um retrovírus da família *Retroviridae*, gênero *Gammaretrovirus* (Coffin *et al.*, 2021) e contém um RNA fita simples e infecta felinos domésticos e selvagens. Esse vírus depende do DNA do hospedeiro para realizar a replicação viral e a infecção geralmente não culmina com morte celular (Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Jarrett; Neil, 2012; Lutz *et al.*, 2009). O genoma proviral do FeLV possui os genes *env*, *gag* e *pol* delimitados por repetições terminais longas (LTRs), as quais são importantes para a regulação viral, tropismo celular e patogenicidade. O gene *env* codifica a proteína gp70, a qual possui um papel na indução de imunidade, na determinação de subgrupo e é um componente importante das vacinas, e a proteína transmembrana p15E, que possui papel na resposta imune do hospedeiro. O gene *pol* codifica a enzima transcriptase reversa, integrase e polimerase, e o *gag* codifica proteínas estruturais, como a p27, a qual é utilizada no diagnóstico. Após a transcrição reversa do RNA viral, o DNA resultante delimitado pelas LTRs se integra no genoma celular do hospedeiro como DNA proviral, estabelecendo uma infecção persistente (Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Jarrett; Neil, 2012; Lutz *et al.*, 2009).

Apesar do FeLV ser um retrovírus exógeno patogênico, há vírus endógenos não patogênicos, a exemplo do vírus da leucemia felina endógeno (enFeLV), o qual está presente no genoma felino, mas não produz partículas virais infecciosas e não é transmitido horizontalmente. Contudo, o enFeLV pode recombinar com um vírus exógeno e levar à formação de novos subgrupos, o que pode aumentar sua patogenicidade (Chiu; Hoover; Vandewoude, 2018; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Lutz *et al.*, 2009). FeLV exógeno é dividido em subgrupos, A, B, C, D e T, os quais são imunologicamente relacionados (Chiu; Hoover; Vandewoude, 2018), e recentemente, foi sugerido um novo subgrupo, denominado FeLV-E (Miyake *et al.*, 2016). O subgrupo A é o único transmitido horizontalmente (vírus parental), sendo que os demais grupos surgem a partir do FeLV-A em gatos infectados. O FeLV-B origina-se da recombinação entre FeLV-A e enFeLV, enquanto o

FeLV-C é menos comum e origina-se de mutações no gene *env* do FeLV-A (Chiu; Hoover; Vandewoude, 2018; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023).

A prevalência de FeLV varia entre os países, e apesar do desenvolvimento de uma vacina vetorizada para FeLV ter levado à diminuição dos casos na Europa e América do Norte (Little *et al.*, 2020; Louwerens *et al.*, 2005; Lutz *et al.*, 2009; Meichner *et al.*, 2012; Studer *et al.*, 2019), muitos países ainda apresentam altas taxas de infecção, como o Brasil, onde há uma prevalência estimada de 28,41% a 31% (Biezus *et al.*, 2019; da Costa *et al.*, 2017; de Mello *et al.*, 2023). Os fatores de risco para desenvolvimento de infecção incluem gênero e raça, em que os gatos machos e sem raça definida são mais propensos a serem infectados, idade, status vacinal, acesso à rua, comportamento agressivo, alta densidade populacional e outras doenças concomitantes (Biezus *et al.*, 2019, 2023a; de Mello *et al.*, 2023; Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020; Lutz *et al.*, 2009; Studer *et al.*, 2019). Há vacinas para FeLV disponíveis em diversas regiões do mundo; conseqüentemente, a identificação e segregação de gatos positivos são essenciais para retardar a disseminação e taxa de transmissão do vírus (Giselbrecht *et al.*, 2023; Little *et al.*, 2020).

O diagnóstico de FeLV é rotineiramente realizado com base na detecção no sangue, soro ou plasma do antígeno p27, e a combinação deste teste imunoenzimático com a reação em cadeia da polimerase (PCR), é de extrema importância para fornecer mais informação sobre o status do gato e auxiliar nas estratégias terapêuticas (Little *et al.*, 2020). Dessa forma, para determinar os diferentes cursos de infecção pelo FeLV, é necessário utilizar diferentes e consecutivas técnicas diagnósticas, sendo a infecção por FeLV classificada como: progressiva, regressiva, abortiva ou focal/atípica (Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Torres; Mathiason; Hoover, 2005). Os gatos progressivamente e regressivamente infectados possuem integração viral no genoma do hospedeiro, com detecção de provírus por meio da PCR, porém apenas na infecção progressiva há detecção de viremia pela presença de antígeno p27 do FeLV livre nos testes rápidos (Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020). Os gatos infectados podem desenvolver diferentes desfechos clínicos, influenciados pela idade e status imune, assim como a carga viral e sua patogenicidade, entre outros fatores (Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Levy *et al.*, 1997; Little *et al.*, 2020). Os gatos progressivamente infectados podem desenvolver uma ampla variedade de doenças, incluindo distúrbio hematológicos e da medula óssea, imunossupressão, doenças imunomediadas, infecções oportunistas e tumores, especialmente linfoma e leucemia (Biezus *et al.*, 2023a; de Mello *et al.*, 2023; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023;

Pandolfo *et al.*, 2024). Os subgrupos também influenciam no desenvolvimento de doenças específicas, em que o FeLV-B geralmente está relacionado com desenvolvimento de neoplasias e o FeLV-C de anemia aplásica (Chiu; Hoover; Vandewoude, 2018).

Em relação às neoplasias, o FeLV causa, principalmente, o desenvolvimento de linfomas e leucemias (Biezus *et al.*, 2023a; Cristo *et al.*, 2019b, 2019a; de Mello *et al.*, 2023; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023). A infecção por FeLV está diretamente associada ao desenvolvimento tumoral, e tal associação foi confirmada pela indução de linfomas em gatos com infecção experimental para FeLV e pela demonstração de que gatos infectados pelo FeLV têm maior chance e risco de desenvolver linfoma quando comparados a gatos não infectados (de Mello *et al.*, 2023; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Pandolfo *et al.*, 2024; Shelton *et al.*, 1990). Neoplasias induzidas por FeLV ocorrem, principalmente, por mutagênese insercional e transdução de proto-oncogenes. A inserção do provírus próximo a proto-oncogenes pode levar à suprarregulação desses genes celulares pelos elementos presentes nas LTRs provirais, levando à oncogênese (Fujino; Ohno; Tsujimoto, 2008). Os *loci* de inserção mais comuns são: *c-myc*, *flvi-1*, *flvi-2*, *fit-1*, *pim-1* e *flit-1* (Fujino *et al.*, 2009; Levesque; Bonham; Levy, 1990; Tsatsanis *et al.*, 1994). Inserção do FeLV em genes supressores de tumores também pode levar à alteração de seus transcritos (Fujino; Ohno; Tsujimoto, 2008). Ademais, FeLV pode incorporar genes das células do hospedeiro e gerar vírus recombinantes (transdução de proto-oncogenes), em que FeLV recombinantes contendo *v-myc* já foram descritos em linfomas de felinos (Fujino; Ohno; Tsujimoto, 2008; Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Jarrett; Neil, 2012; Tsatsanis *et al.*, 1994).

Estudos demonstram uma diminuição da prevalência de infecção por FeLV em gatos com linfomas em países com programas de controle e vacinação efetivos, em que 13 a 21% dos gatos com linfomas são infectados pelo FeLV. Dessa forma, sugeriu-se uma mudança na causa do tumor, dado que o número de linfomas cresceu, mesmo com a diminuição da infecção por FeLV (Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023; Louwerens *et al.*, 2005; Meichner *et al.*, 2012; Stützer *et al.*, 2011). Entretanto, estudos recentes no Brasil, país com alta prevalência de gatos FeLV positivos, demonstraram a associação entre a infecção por FeLV e a ocorrência de leucemia ou linfoma (Cristo *et al.*, 2019b, 2019a; de Mello *et al.*, 2023; Leite-Filho *et al.*, 2020; Pandolfo *et al.*, 2024), em que aproximadamente 55% dos gatos com linfoma são FeLV-positivos (de Mello *et al.*, 2023; Leite-Filho *et al.*, 2020). Linfomas mediastinais são frequentemente associados à infecção por FeLV (Cristo *et al.*, 2019b, 2019a; Leite-Filho *et al.*,

2020; Tsatsanis *et al.*, 1994) e representam um dos principais tipos de linfoma diagnosticados em felinos no Sul do Brasil (Cristo *et al.*, 2019b; Leite-Filho *et al.*, 2020).

Em relação ao desenvolvimento de leucemia, todas as células hematopoiéticas na medula óssea são suscetíveis à transformação pelo FeLV, e conseqüentemente doenças mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas podem ocorrer (Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023). Um estudo recente no Brasil constatou uma associação entre o FeLV e o desenvolvimento de leucemia, em que até 78,4% dos gatos com leucemia eram positivos na análise imuno-histoquímica anti-gp70 (Cristo *et al.*, 2019a; Pandolfo *et al.*, 2024).

Outras doenças não neoplásicas relacionadas à infecção por FeLV já foram descritas, e incluem, principalmente, distúrbios hematopoiéticos, como anemia, neutropenia, trombocitopenia e pancitopenia, sendo que replicação viral é necessária para que a maioria dos processos patogênicos de supressão da medula óssea ocorra. Doenças imunomediadas também podem ocorrer em associação à infecção por FeLV e incluem anemia hemolítica autoimune, glomerulonefrite, uveíte e poliartrite (Hartmann; Hofmann-Lehmann; Sykes, 2023).

FeLV está entre os vírus mais importantes que causam doenças em gatos no Brasil, país onde há alta prevalência de infecção, principalmente, devido a falhas vacinais e à grande quantidade de gatos de vida livre ou com acesso à rua (Biezus *et al.*, 2019). Esse vírus causa infecções persistentes, portanto sua detecção está associada com cuidados veterinários a longo prazo (Little *et al.*, 2020). Devido a isso, o diagnóstico representa um grande impacto para os tutores, visto que gatos infectados necessitam de consultas e exames frequentes, além de estarem mais predispostos a desenvolverem doenças graves e terem expectativa de vida mais curta.

Apesar de existirem estudos investigando a prevalência de gatos infectados por FeLV no Brasil, poucos realizam caracterização patológica e molecular de determinados tipos linfomas associados à infecção (Biezus *et al.*, 2023b). Além disso, estudos avaliando o transcriptoma de gatos infectados por FeLV e com linfoma por meio de sequenciamento de RNA nunca foi realizado anteriormente, bem como não há estudos associando múltiplas técnicas diagnósticas convencionais e moleculares para caracterizar a infecção e patogênese da infecção por FeLV. A análise detalhada da infecção por FeLV, distribuição tecidual, tropismo celular e efeitos no hospedeiro é essencial para compreender melhor a patogênese da infecção por FeLV.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as características clínico-patológicas e moleculares de determinados tipos de linfoma em gatos infectados por FeLV, incluindo

linfomas tímicos e aqueles envolvendo o sistema digestivo e terceira pálpebra. Ademais, objetivou-se determinar o tropismo celular do FeLV e traçar o perfil transcricional de linfomas tímicos.

## 2 ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Large B-cell lymphoma affecting the third eyelid of two FeLV-infected cats**”, o qual encontra-se publicado no periódico “*Veterinary Ophthalmology*”, com endereço de DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vop.13241>.

## Abstract

Lymphoma is one of the most frequently diagnosed tumors in FeLV-infected cats. Extranodal lymphomas include lymphomas in ocular and periocular tissues, such as the third eyelid (TEL), which is an uncommonly diagnosed type of lymphoma in cats. This study aimed to describe the clinicopathological features of lymphoma in the TEL of two FeLV-infected cats. A retrospective study in two anatomic pathology laboratories was performed, and two cases met the inclusion criteria. A 4-year-old female cat, positive for FIV gp40 antigen and FeLV gp70 antigen by immunohistochemistry (IHC), and a male cat of 22 months old, positive both serologically for FeLV p27 antigen and for FeLV gp70 antigen by IHC, were referred to veterinary clinics with unilateral swelling and mass in the TEL, which had rapid growth in case 2. Histological and immunohistochemical analysis established the final diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma in both cases. The cat in case 2 died 4 months after the diagnosis, with clinical worsening prior to death. Necropsy was not performed in either case, which precluded the definition of a primary or secondary involvement. However, the ocular lesions were the reason for consultation in both cases and it may have been an initial manifestation of a multicentric disease. Thus, FeLV-infected cats with clinical finding of eyelid swelling or mass formation should have lymphoma as a differential diagnosis and a complete physical examination should be performed to detect extraocular involvement.

**Keywords:** conjunctival lymphoma; feline; neoplasm; nictitating membrane; retrovirus; third eyelid.

### 3 ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Pathological characterization of lymphomas with involvement of the alimentary tract in FeLV-infected cats**”, o qual foi redigido sob as normas do periódico *Veterinary Pathology*.

Artigo a ser submetido.

Pathological characterization of lymphomas with involvement of the alimentary tract  
in FeLV-infected cats

Paula Reis Ribeiro<sup>1,2\*</sup>, Lauren Santos de Mello<sup>1,2</sup>, Emanoelly Machado Sousa da  
Silva<sup>1,2</sup>, Calvin Ferreira Siqueira<sup>1</sup>, Rafael Biondo Rosa<sup>1,2</sup>, Marcele Bettim  
Bandinelli<sup>1,2</sup>, David Driemeier<sup>1,2</sup>, Welden Panziera<sup>1,2</sup>, Luciana Sonne<sup>1,2</sup>, Saulo  
Petinatti Pavarini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Setor de Patologia Veterinária, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de  
Veterinária, (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto  
Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil.

\* Corresponding author: Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil.

Phone number: +555133086107. E-mail address: paularibeiro2195@gmail.com

## Abstract

Lymphoma is a common neoplasm in cats, in which alimentary lymphoma is a common subtype, and it is especially diagnosed in elderly, FeLV-negative cats. This study aimed to describe the gross, histologic and immunohistochemical features of lymphoma with involvement of the alimentary tract in FeLV-antigen positive cats. In a 12-year retrospective study, 32 necropsied and FeLV-infected cats with lymphoma affecting the alimentary system were found. The median age was 4 years. Twenty cases were multicentric lymphomas with secondary involvement of the alimentary tract, and the remaining 12 cats were considered to have primary alimentary lymphoma. The small intestine (SI) was the most common anatomic location (23/32 cases; 72%), followed by the large intestine (LI) (19/32; 59%) and stomach (18/32 cases; 56%), which were concomitantly affected in most cases (22/32; 69%). Thickening of the intestinal and gastric wall was the most common gross lesion (23/32 cases; 72%) (16 in SI, 6 in LI, 1 in stomach), while wall nodules were observed in 16/32 cats (50%) (10 in SI, 6 in LI, 4 in stomach). The mesenteric lymph node was frequently affected (25/32; 78%). Most lymphomas were of large (17/32; 53%) and intermediate cells (14/32; 44%). B-cell lymphomas were more frequent (24/32; 75%), and diffuse large B-cell lymphoma was the most common diagnosis (15/32; 47%). Lymphomas affecting the alimentary system may be observed in FeLV-infected and young adult cats, of which large to intermediate and B-cell lymphomas are more frequently observed, and low-grade small cell intestinal lymphoma is unlikely to be diagnosed.

**Keywords:** alimentary lymphoma, feline, gastrointestinal, immunophenotype, neoplasm, retrovirus

#### **4 ARTIGO 3**

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Characterization and Transcriptional Landscape of Feline Leukemia Virus (FeLV)-induced Thymic Lymphoma in Cats**”, o qual foi redigido sob as normas do periódico *Journal of Virology*.

Artigo a ser submetido.

## **Characterization and Transcriptional Landscape of Feline Leukemia Virus (FeLV)-induced Thymic Lymphoma in Cats**

Paula Reis Ribeiro<sup>1,2</sup>/Lauren Santos de Mello<sup>1,2</sup>/Côme J. Thieulent<sup>3,4</sup>/Wellesley Dittmarb<sup>3,4</sup>/  
Chandika Damesh Gamage<sup>3,4</sup>/Saulo Patinatti Pavarini<sup>1,2</sup>/Udeni B.R. Balasuriya<sup>3,4</sup>/Mariano  
Carossino<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil.  
91540-000.

<sup>3</sup> Louisiana Animal Disease Diagnostic Laboratory, School of Veterinary Medicine, Louisiana  
State University, Baton Rouge, LA 70803, USA

<sup>4</sup> Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State  
University, Baton Rouge, LA 70803, USA

\*Corresponding author

### **Abstract**

Feline leukemia virus (FeLV) is an oncogenic retrovirus affecting domestic cats worldwide and infection has been associated with development of lymphoma. The prevalence of FeLV-induced thymic lymphoma is still high in many countries, but many studies related to FeLV are dated before the development of modern diagnostic molecular techniques. We aimed to fully characterize the pathological and molecular features of thymic lymphoma in FeLV-infected cats, and investigate the cell tropism, tissue distribution via in situ hybridization and the transcriptional landscape of this tumor by RNA sequencing. The cats were progressively infected, with detection of high RNA loads in tumor, lymph node, spleen and small intestine by RT-qPCR, and FeLV p27 antigen within the tumor by immunohistochemistry. Widespread tropism was confirmed based on RNAscope® ISH results, with detection FeLV of mRNA in hematopoietic, lymphoid, epithelial and mesenchymal cells throughout the body, including cells not previously described to be infected by FeLV. Transcriptome analysis revealed a total of 536 differentially expressed genes, including 289 downregulated and 247 upregulated. Transcriptional landscape of FeLV-induced lymphoma showed differentially expressed genes

mostly involved in ribosome biogenesis, rRNA processing, cell cycle and DNA repair, of which the most likely mechanism of tumor induction was insertional mutagenesis in *flvi-2* locus, based on upregulation of *BMI1*. We demonstrated widespread cell tropism, with infected cells not previously described, which may play a role in FeLV pathogenesis and transmission. More studies on transcriptome of FeLV-induced tumors should be performed to clarify the differences in gene expression in the variety of tumors caused by FeLV.

### **Importance**

FeLV-related mortality is common in several countries, highlighting the relevance of this virus for feline medicine. Recently developed techniques, such as RNA sequencing and RNAscope® in situ hybridization, have not been used to investigate the tissue distribution, cell tropism and transcriptional profile of FeLV-related diseases. We described the gene expression profile of thymic lymphoma and widespread viral tropism, with infected cell types not yet described. This is the first study to use the combination of several techniques to describe FeLV-induced lymphoma, including transcriptome analysis, opening path for further investigations on FeLV pathogenesis, cell tropism and gene expression profile, especially in other types of tumors. Transcriptional analysis and demonstration of widespread tropism in unexpected cell types shed a light on the potential role of different cells in viral pathogenesis, and the possibility of determining possible therapeutic targets to help extend survival time of FeLV-infected cats. This study may serve as a basis for future investigations into FeLV pathogenesis and transcriptional landscape of FeLV-related diseases.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Infecção por FeLV ainda é altamente frequente no Sul do Brasil, com prevalência de 37%, bem como doenças associadas à infecção progressiva, em especial linfoma;
- Linfoma deve ser incluído como diagnóstico diferencial de aumento de volume e massas em terceira pálpebra de gatos, principalmente em felinos infectados pelo FeLV;
- Linfoma em terceira pálpebra de felinos pode ser uma neoplasia primária ou uma apresentação inicial de um linfoma multicêntrico, portanto estadiamento clínico completo e, em caso de óbito, necrópsia são essenciais para determinar se há envolvimento extraocular;
- Apesar de linfomas do sistema digestivo serem frequentemente associados a gatos FeLV-negativos e idosos, esse tumor também é diagnosticado em animais infectados pelo FeLV, com apresentação histológica e imuno-histoquímica distinta;
- Gatos infectados pelo FeLV e com linfoma envolvendo o sistema digestivo eram jovens, e a apresentação mais frequente foi de linfomas multicêntricos com acometimento secundário do sistema digestivo, de linfócitos B intermediários a grandes e o principal diagnóstico foi linfoma difuso de grandes células B;
- O linfoma intestinal de pequenas células T, o qual é o tipo de linfoma alimentar mais frequentemente diagnosticado em gatos FeLV-negativos, não foi diagnosticado em felinos infectados pelo FeLV no período analisado, representando um diagnóstico improvável nesse grupo de animais;
- Tropismo celular disseminado foi observado em gatos infectados por FeLV e com linfoma tímico, afetando diferentes tipos celulares, incluindo células linfóides, hematopoiéticas, epiteliais e mesenquimais, sendo que algumas células nunca foram descritas em infecção por FeLV;
- Linfomas tímicos induzidos por FeLV apresentam expressão gênica distinta de timos normais de gatos FeLV-negativos, com um total de 536 genes diferentemente expressos, os quais estavam envolvidos predominantemente com processamento de rRNA, biogênese de ribossomos, ciclo celular e reparo de DNA;
- O mecanismo de indução tumoral mais provável dos linfomas tímicos induzidos por FeLV estudados foi de mutagênese no *locus flvi-2*, baseado no aumento da expressão do gene *BM11* detectado por meio do sequenciamento de RNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIEZUS, Giovana *et al.* Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 17–21, 1 abr. 2019.
- BIEZUS, Giovana *et al.* Progressive and regressive infection with feline leukemia virus (FeLV) in cats in southern Brazil: Prevalence, risk factors associated, clinical and hematologic alterations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 216, p. 105945, 1 jul. 2023a.
- BIEZUS, Giovana *et al.* Phylogenetic identification of feline leukemia virus A and B in cats with progressive infection developing into lymphoma and leukemia. **Virus Research**, v. 329, p. 199093, 2023b.
- CHIU, Elliot.; HOOVER, Edward; VANDEWOUDE, Sue. A retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: Viral interference assays to deep sequencing. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 29, 10 jan. 2018.
- COFFIN, John *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 12, 2021.
- COSTA, Ferna Vieira Amorim *et al.* Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1531–1536, 1 dez. 2017.
- CRISTO, Thierry *et al.* Feline Leukaemia Virus Associated with Leukaemia in Cats in Santa Catarina, Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 170, p. 10–21, 1 jul. 2019a.
- CRISTO, Thierry *et al.* Feline Lymphoma and a High Correlation with Feline Leukaemia Virus Infection in Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 166, p. 20–28, 1 jan. 2019b.
- DE MELLO, Lauren Santos *et al.* Diseases associated with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection: A retrospective study of 1470 necropsied cats (2010–2020). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 95, p. 101963, 1 abr. 2023.
- FUJINO, Yasuhito. *et al.* Identification of a novel common proviral integration site, flit-1, in feline leukemia virus induced thymic lymphoma. **Virology**, v. 386, n. 1, p. 16–22, 30 mar. 2009.
- FUJINO, Yasuhito; OHNO, Koichi; TSUJIMOTO, Hajime. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: Insertional mutagenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 138–143, 15 maio 2008.
- GISELBRECHT, Juliana *et al.* Prevalence of Different Courses of Feline Leukaemia Virus Infection in Four European Countries. **Viruses**, v. 15, n. 8, p. 1718, 1 ago. 2023.

HARTMANN, Katrin. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3–4, p. 190–201, 15 out. 2011.

HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, Regina. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 50, n. 5, p. 1013–1036, 1 set. 2020.

HARTMANN, Katrin; HOFMANN-LEHMANN, Regina.; SYKES, Jane. **Feline Leukemia Virus Infection**. Em: SYKES, J. (Ed.). *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2023. p. 1180–1295.

HOFMANN-LEHMANN, Regina. *et al.* How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1–2, p. 119–123, 15 maio 2008.

JARRETT, Oswald.; NEIL, James. **Feline Leukaemia Virus**. Em: *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley, 2012.

LEITE-FILHO, Ronaldo Viana *et al.* Epidemiological, pathological and immunohistochemical aspects of 125 cases of feline lymphoma in Southern Brazil. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 2, p. 224–230, 1 jun. 2020.

LEVESQUE, Karin; BONHAM, Lynn; LEVY, Laura. Flvi-1, a common integration domain of feline leukemia virus in naturally occurring lymphomas of a particular type. **Journal of Virology**, v. 64, n. 8, p. 3455–3462, julho 1990.

LEVY, Laura *et al.* Cooperating events in lymphomagenesis mediated by feline leukemia virus. **Leukemia**, v. 11, p. 239–241, 1997.

LITTLE, Susan *et al.* 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 1, p. 5–30, 1 jan. 2020.

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

LUTZ, Hans *et al.* Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 565–574, 2009.

MEICHNER, Kristina *et al.* Changes in prevalence of progressive feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma in Germany. **The Veterinary Record**, v. 171, n. 14, p. 348, 6 out. 2012.

MIYAKE, Ariko *et al.* Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. **Journal of Virology**, v. 90, n. 9, p. 4832–4837, maio 2016.

PANDOLFO, Gustavo Wilian *et al.* Neoplastic and non-neoplastic diseases associated with feline leukaemia virus (FeLV) in cats in southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 112, p. 102228, 2024.

SHELTON, Grady *et al.* Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infections and Their Relationships to Lymphoid Malignancies in Cats: A Retrospective Study (1968-1988). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 3, p. 623–630, 1990.

STUDER, Nadine *et al.* Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection - Reported by the european advisory board on cat diseases (ABCD Europe). **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 993, 29 out. 2019.

STÜTZER, Bianca *et al.* Incidence of persistent viraemia and latent feline leukaemia virus infection in cats with lymphoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 2, p. 81–87, fev. 2011.

TORRES, Andrea; MATHIASON, Candace; HOOVER, Edward. Re-examination of feline leukemia virus: Host relationships using real-time PCR. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 272–283, 5 fev. 2005.

TSATSANIS, Christos *et al.* 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.