



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ANEMIA NO REGENERATIVA EN FELINOS:
USO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO
PARA UNA CORRECTA VALORACIÓN DEL PACIENTE ANÉMICO**

Dra. Patricia Lindiman

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
Año 2023**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ANEMIA NO REGENERATIVA EN FELINOS:
USO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO
PARA UNA CORRECTA VALORACIÓN DEL PACIENTE ANÉMICO**

Dra. Patricia Lindiman

Dra. Ana Paula Pessina
Director de Tesis

Dra. Graciela Pedreira
Co-director

PhD. Florencia Mosquillo

Co-director

Dra. Rosina Sánchez

Co-director

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

Prof. Dra. AGUSTINA ALGORTA
(Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Uruguay)

Prof. Dra. NATALIE RUIZ
(Departamento de Clínica y Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria,
Uruguay)

Licenciada ANDREINA BRUGNINI
(Laboratorio de Citometría y Biología Molecular. Dpto Básico de Medicina,
Hospital de Clínicas, Uruguay)



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

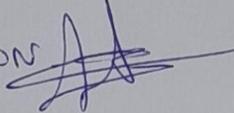
ORIENTACIÓN: SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: FVET, 9/11/2023

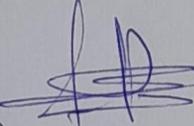
TRIBUNAL: AGUSTINA ALGORTA, NATALIE RUÍZ, ANDREINA BRUGNINI

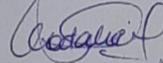
CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3905320-4	LINDIMAN GOROSITO, MARCELA PATRICIA	S.S.S	12

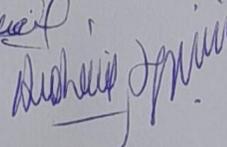
NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

APROBADA CON MENCIÓN 

TRIBUNAL

Agustina Algorta 

Natalie Ruiz 

Andreina Brugini 

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representó un gran desafío en mi vida, tanto a nivel profesional como personal y al culminar esta etapa quisiera expresar mi mas profundo agradecimiento a mis maestras Rosina Sánchez, Florencia Mosquillo, Graciela Pedreira y Paula Pessina, por su invaluable paciencia, por ser mis guías constantes, cada una contribuyendo y transmitiendo su experiencia motivándome a alcanzar alturas inimaginables. Asimismo, a Ana Meikle, Andreina Brugnini, Adrián Carzoli y Gabriel Piriz quienes representaron una pieza fundamental en este trabajo.

Quiero agradecer infinitamente a mi familia, a quien amo profundamente y principalmente a mi hijo Matias, por las horas de ausencia, por su amor incondicional, por su apoyo en todo momento, han sido y son, el gran pilar de mi vida, mi motor en cada emprendimiento.

Un sincero agradecimiento a todos mis amigos y compañeros de trabajo, por su colaboración y ser mi equipo de aliento y confianza.

Por último, no quiero dejar de agradecer a mis gatitos Gastón, Fede y Faku quienes me motivan a continuar en este camino gratificante de la investigación.

CONTENIDO

1- RESUMEN.....	7
2- SUMMARY	8
3- INTRODUCCION.....	9
4- ANTECEDENTES.....	11
4.1- ERITROPOYESIS.....	11
4.2- ANEMIA EN FELINOS	15
4.3- CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS.....	15
4.4- ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGÍA	16
4.5- ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LAS CAUSAS DE ANEMIAS	23
4.6- ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE CAUSAS DE ANEMIA	25
4.7- EVALUACIÓN DE LA MEDULA ÓSEA (MIELOGRAMA)	26
4.8- ABORDAJE DIAGNOSTICO DE PATOLOGÍAS DE MÉDULA ÓSEA	32
5- CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	36
6- HIPÓTESIS.....	37
7- OBJETIVOS.....	37
8- MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.1- PUESTA A PUNTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE FELINOS	38
8.2- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	48
8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	50
9- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
9.1 PUESTA A PUNTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE FELINOS	51
9.2- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	58
9.3- RELACIÓN CD4/CD8 EN ANIMALES ANÉMICOS POSITIVOS A VIF Y VILEF .	65
8- CONCLUSIONES	68
9- ANEXOS.....	69
10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1- RESUMEN

La anemia no regenerativa en felinos es un hallazgo frecuente en medicina veterinaria. Las causas subyacentes a la anemia no regenerativa son variadas y un desafío diario para el veterinario clínico. La utilización de diversos métodos y herramientas diagnósticas permitirán avanzar en la investigación de las diferentes patologías de esta especie, en la que los recursos bibliográficos son escasos. En particular, el estudio de la médula ósea y la aplicación de la citometría de flujo son esenciales para diagnosticar las patologías que causan anemia en felinos. En este trabajo se analizó sangre periférica de 32 felinos, que conformaron 2 grupos de animales: felinos sanos (n=15) y felinos con anemia no regenerativa (n=17). Los gatos anémicos evidenciaron parámetros hematológicos de la línea roja en concordancia con el cuadro clínico presente. El conteo de reticulocitos automatizado se realizó por citometría de flujo, observándose altos valores de correlación con respecto al método manual (coeficiente de Pearson de 0.93). Por su parte, en la línea blanca se obtuvo un valor de linfocitos absolutos significativamente menor en el grupo de anémicos. En este sentido, las subpoblaciones linfocitarias fueron evaluadas mediante citometría de flujo, empleando los marcadores panleucocitario y linfocitarios, no encontrándose diferencias significativas en las distintas poblaciones entre ambos grupos. La bioquímica sérica mostró diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con anemia no regenerativa en los siguientes analitos: urea, albúmina, FAS y bilirrubina total. En el grupo anémico la positividad a VIF y ViLeF, fué de 6% y 17.5%, respectivamente, siendo doble positivo el 23.5%. Por otro lado, en muestras de médula ósea de felinos sanos (n=5) se realizó mielograma y análisis por citometría de flujo, no pudiéndose estandarizar la población medular debido al bajo porcentaje de viabilidad celular. En suma, este trabajo de tesis permitió abordar en forma integral las causas subyacentes a las anemias no regenerativas utilizando herramientas no disponibles hasta el momento en nuestro país. Los desarrollos metodológicos aquí presentados permitieron caracterizar las diferentes poblaciones celulares en sangre periférica de felinos, así como el recuento de reticulocitos en pacientes anémicos mediante citometría de flujo. Asimismo, estas herramientas permitirán complementar el diagnóstico de otras patologías de origen linfocitario en felinos, representando un valioso aporte para la clínica veterinaria.

2- SUMMARY

Non-regenerative anemia in felines is a common occurrence in veterinary medicine. The causes of non-regenerative anemia are diverse and represent a daily challenge for clinical veterinarians. The application of various diagnostic methods and tools can facilitate advancements in understanding the different pathologies in this species, for which bibliographic resources are limited. Specifically, studying the bone marrow and implementing flow cytometry are essential for diagnosing the pathologies causing anemia in felines. In this study, the peripheral blood of 32 cats was analyzed, divided into two groups: healthy cats (n=15) and cats with non-regenerative anemia (n=17). The anemic cats demonstrated hematological parameters of the erythrocytic line consistent with their clinical picture. The automated reticulocyte count was performed using flow cytometry, which showed high correlation values relative to the manual method (Pearson's coefficient of 0.93). In contrast, within the leukocytic line, a significantly lower absolute lymphocyte value was observed in the anemic group. Flow cytometry was used to evaluate lymphocyte subpopulations, employing panleukocyte and lymphocytes markers. However, no significant differences were found in the various populations between the groups in this study. Serum biochemistry revealed significant differences between the control group and patients with non-regenerative anemia in the following analytes: urea, albumin, ALP, and total bilirubin. Regarding the positive serology within the group of anemic animals for FIV and FeLV, percentages of 6% and 17.5% were found respectively, and 23.5% tested positive for both. On the other hand, bone marrow samples were taken from healthy cats (n=5) for myelogram and flow cytometric analysis. Unfortunately, standardizing the marrow population was not possible due to the low percentage of cell viability. In summary, this thesis enabled a comprehensive examination of the underlying causes of non-regenerative anemias using tools that were previously unavailable in our country. The methodological advancements presented here allowed for the characterization of different cell populations in feline peripheral blood and the counting of reticulocytes in anemic patients through flow cytometry. These tools also have the potential to augment the diagnosis of other lymphocyte-origin pathologies in felines, thereby making a significant contribution to veterinary clinical practice.

3- INTRODUCCION

La anemia, es uno de los hallazgos clínicos y laboratoriales más frecuentes en medicina veterinaria siendo de vital importancia conocer las causas que la desencadenan. Las anemias no regenerativas se presentan con mayor cronicidad y en ocasiones con mayor severidad y su detección se basa en la evaluación del hemograma y en el recuento disminuido de reticulocitos. Si bien se ha reportado a nivel internacional que este tipo de anemia es frecuente en felinos (Winzelberg y Hohenhaus, 2019), en Uruguay no tenemos información al respecto. Existen varias causas que la provocan incluyendo las enfermedades inflamatorias, falla renal crónica, hipotiroidismo, retrovirus o patologías hematopoyéticas primarias. Varias de estas causas pueden ser descartadas empleando un panel de bioquímica sérica básico. Así mismo la presencia de patógenos virales como el Virus de Leucemia Felina (ViLeF) y de la Inmunodeficiencia Felina (VIF) se diagnostican con pruebas serológicas y a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, se ha descrito la presencia de falsos negativos con ambas metodologías, ya que estos retrovirus permanecen en fase de latencia sin ser posible su detección (Galdo y col., 2016). Estas enfermedades virales aumentan el riesgo de desarrollar síndromes linfoproliferativos (linfoma y leucemia) siendo necesaria la evaluación de sangre periférica y médula ósea, en busca de hipoplasia, displasia y/o morfología celular anormal orientativas de estas patologías (Grindem y col., 2009). La anemia no regenerativa también puede ser causada por patologías medulares primarias como la aplasia de las células rojas, la anemia hemolítica no regenerativa crónica, síndromes mielodisplásicos, etc. (Winzelberg y Hohenhaus, 2019). La evaluación citológica de la médula ósea (mielograma) es imprescindible para determinar estos trastornos, permitiendo, además, en algunos casos determinar el pronóstico y la elección y/o monitoreo de un tratamiento específico. Sin embargo, a nivel internacional, los estudios de mielograma en felinos son muy escasos (Byers, 2017) y en nuestro país inexistentes.

Una de las limitantes del mielograma es que no permite la caracterización funcional de las distintas poblaciones celulares de la médula ósea, teniendo que recurrir a otras herramientas diagnósticas. En humanos, la inmunofenotipificación por citometría de flujo, utilizando marcadores celulares, permite caracterizar las células sanguíneas y sus precursores. Así mismo es de utilidad para estudiar las características de la maduración de dichos precursores y/o la expresión anómala de marcadores inmunofenotípicos (van de Loosdrech ,2013; Zini, 2017).

El Consorcio Internacional de la Red Europea ha determinado el rol de la citometría de flujo en los síndromes mielodisplásicos en humanos, afirmando que la metodología debe ser usada para la caracterización de la patología, el diagnóstico y el pronóstico, además de predecir la respuesta a los tratamientos (van de Loosdrech y col., 2013; Wood, 2015). El estudio de patologías hematológicas en felinos es de interés ya que se ha considerado un modelo animal apropiado para humanos para estudiar anemias y leucemias relacionadas a la médula ósea (Araghi y col., 2013). A nivel internacional, el uso de marcadores para células de sangre periférica y médula ósea a través de citometría de flujo en felinos es muy poco frecuente. En sangre periférica de felinos sanos, los trabajos

datan de décadas atrás (Dean y col., 1995; Walker y col. 1995; Hoffmann-Fezer y col., 1996; Knotek y col., 2000; Campbell y col., 2004). Más recientemente, Araghi y col. (2013) emplearon anticuerpos disponibles en humanos para inmunofenotipificar células hematopoiéticas y de la médula ósea en 4 felinos. Por su parte, Rout y col. (2020) realizaron una caracterización inmunofenotípica en gatos con linfocitosis, y Rutgen y col (2022) analizaron la composición de subpoblaciones de linfocitos de nódulos linfáticos periféricos normales y levemente reactivos en gatos. Sin embargo, en felinos con anemias no regenerativas, no hemos encontrado estudios que caractericen la población de sangre periférica ni de aspirado de médula ósea utilizando citometría de flujo.

La finalidad de esta tesis consistió en analizar muestras de sangre periférica para establecer si existen patrones diferenciales en los distintos marcadores celulares inmunofenotipificando por citometría de flujo, entre felinos con anemia no regenerativa y animales sanos. Asimismo, en muestras de médula ósea, analizadas por citología e inmunofenotipificación, nos propusimos establecer el patrón celular en gatos sanos (porcentajes de células eritroides, mieloides y marcadores celulares específicos de linaje linfoide) para poder discriminar posteriormente pacientes con afecciones medulares.

4- ANTECEDENTES

4.1- ERITROPOYESIS

Para poder entender la patogénesis y clasificar las anemias (regenerativa vs no regenerativas) así como las patologías relacionadas con la médula ósea, es necesario hacer una revisión de la eritropoyesis, su fisiología y regulación. La eritropoyesis es el proceso por el cual se producen los eritrocitos. El eritrocito es la unidad funcional del tejido eritroide, es decir la mínima expresión de tejido capaz de realizar la función de producción, transporte y protección de la hemoglobina (Hb). El eritrón está compuesto por la médula eritroide y los eritrocitos circulantes. El tejido que da origen a todas las células de la sangre se conoce como tejido hematopoyético. La hematopoyesis consiste en la formación, el desarrollo y maduración de todas las células de la sangre.

La hematopoyesis comienza en el saco vitelino del embrión, siendo el hígado y el bazo los principales órganos hematopoyéticos en el desarrollo fetal temprano; mientras que, en la segunda mitad del desarrollo fetal, la médula ósea y los órganos linfoides periféricos se transforman en sitios hematopoyéticos significativos. En el nacimiento, la médula ósea tiene actividad hematopoyética en todos los huesos, pero a medida que el animal se desarrolla y disminuye la demanda de eritrocitos, la médula ósea activa es reemplazada por médula amarilla (forma inactiva). En el adulto, la hematopoyesis activa continúa en los huesos planos (esternón, costillas, pelvis, huesos del cráneo y vértebras) y en las epífisis de los huesos largos. El bazo y el hígado constituyen los órganos hematopoyéticos potenciales, con capacidad hematopoyética en casos excepcionales (hematopoyesis extramedular). En la médula ósea la eritropoyesis se produce en el espacio extravascular en islotes alrededor de macrófagos centrales quienes fagocitan el material nuclear extruído, almacenan hierro como hemosiderina y proporcionan hierro en forma de ferritina para la síntesis del grupo hemo (Villiers, 2009).

Todos los tipos de células hemáticas son producidos en forma continua a partir de células madre primitivas (célula madre precursora pluripotencial indiferenciada) que pueden desarrollarse hacia las distintas series celulares hematopoyéticas. De esta forma se producen células progenitoras de la línea linfoide, productoras de linfocitos y células progenitoras de la línea mieloide donde se originan los eritrocitos, megacariocitos y granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), (Figura 1), (Junqueira y Carneiro, 2008; Car, 2010, Mira, 2015).

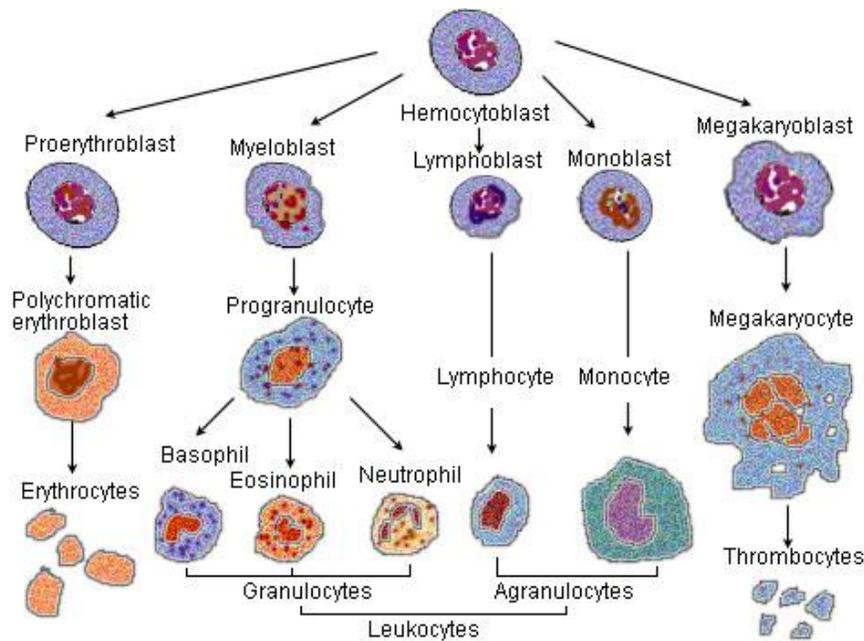


Figura 1. Esquema de hematopoyesis. Tomado de First Aid for the USMLE Step 1:2010 20 th Anniversary Edition. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Las células progenitoras de la línea mieloide se caracterizan por la autorrenovación, proliferación y diferenciación. En el caso de la eritropoyesis, la secuencia de maduración de la célula precursora eritroide hasta el eritrocito maduro, presenta una serie de estadios con determinadas características morfológicas. De acuerdo con las necesidades de células eritropoyéticas, una proporción de esta población ingresa a un compartimiento de células progenitoras. Se pueden identificar dos subgrupos de células progenitoras que dan origen a hematíes maduros, la unidad formadora de blastos eritroides (BFU-E) y la unidad formadora de colonias eritroides (CFU-E); ésta última da origen al pronormoblasto. Esta es la primera célula reconocible morfológicamente en un aspirado de médula ósea (Cowell y col., 2010). Mediante la multiplicación y procesos irreversibles de maduración el pronormoblasto (proeritroblast) produce los hematíes. Durante la primera parte del proceso de maduración se producen 4 divisiones mitóticas (Figura 2), de modo que cada pronormoblasto dará origen a 16 hematíes maduros que sufren maduración progresiva.

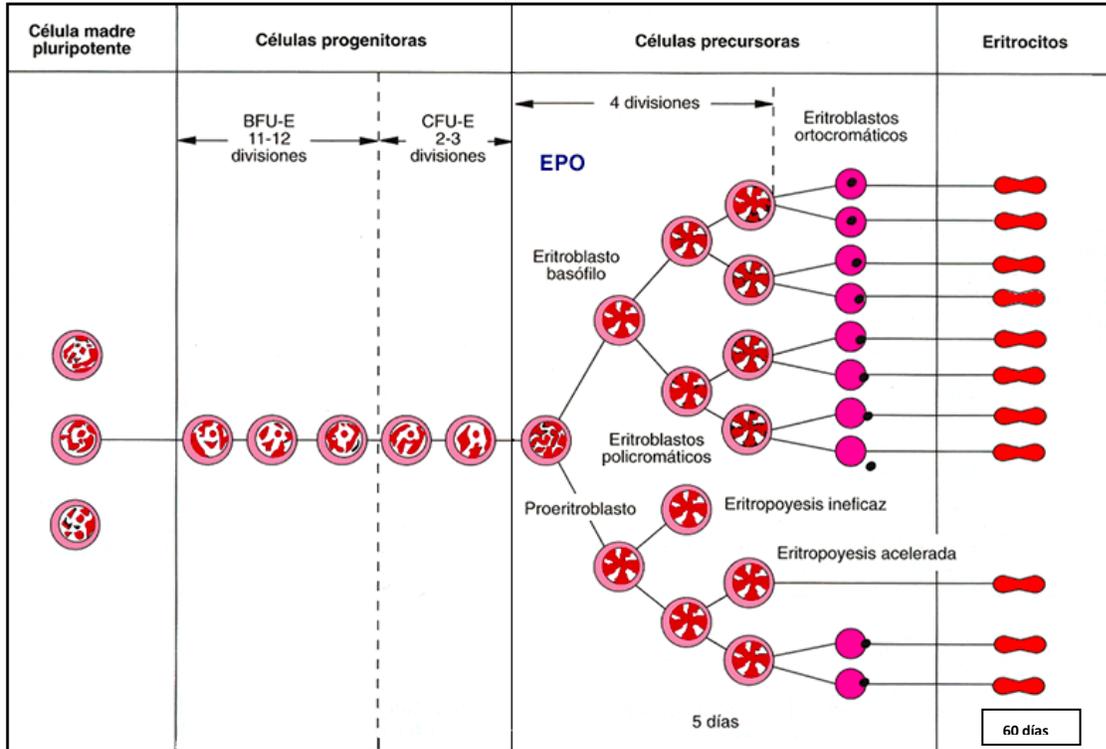


Figura 2. Esquema del proceso de eritropoyesis. Tomado de Anemia Drepanocítica homocigoto y heterocigoto. Reporte de dos casos-Scientific Figure on ResearchGate.

Durante el proceso de división y maduración eritroide se produce la reducción progresiva del tamaño, la disminución de la relación núcleo/citoplasma y la condensación de cromatina nuclear. Conjuntamente se produce el aumento en la cantidad de hemoglobina observándose la hemoglobinización, proceso por lo cual se va modificando el color del citoplasma que pasa de ser basófilo (azul oscuro) a uno más claro y finalmente ser acidófilo en el eritrocito maduro. En el último estadio de normoblasto ortocromático, el núcleo se vuelve picnótico, la célula es incapaz de sintetizar ADN y por ello no puede realizar más divisiones. El núcleo de la célula es expulsado cuando la célula ha sintetizado entre un 75 % de hemoglobina, aunque retiene algo de su ARN. Esta célula se llama reticulocito y continúa con la síntesis de la hemoglobina y la expulsión de los organelos antes de transformarse en el eritrocito maduro (Meder, 2012).

4.1.1 Regulación de la eritropoyesis

La proliferación de las células madre y progenitoras requiere de la presencia de factores de crecimiento hematopoyéticos específicos que pueden ser producidos localmente (médula ósea) o producidos por tejidos periféricos y, transportados hasta la médula ósea mediante la sangre (transporte humoral). Entre los factores estimulantes se encuentran productos de macrófagos (GM-CSF: factor estimulante de colonias granulomonocítica) y de linfocitos T (IL3: interleuquina 3), también las prostaglandinas (PGI₂ y PGE₂) y ciertas linfocinas (Schalm's, 2010). El factor más importante en la regulación y control de la producción de glóbulos rojos es la eritropoyetina (EPO). La eritropoyetina estimula la

diferenciación de BFU-E en CFU-E; el pasaje de CFU-E a pronormoblasto y la proliferación de pronormoblastos; la mitosis y maduración del normoblasto ortocromático e induce la liberación de reticulocitos hacia la circulación (Villiers, 2009, Mira, 2015, Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 a).

La acción de la eritropoyetina primaria es la de estimular la síntesis de ADN. La eritropoyesis también es estimulada por hormonas no hemopoyéticas como las hormonas tiroideas, andrógenos, hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), cortisol, prolactina, epinefrina, norepinefrina y angiotensina (Villiers, 2009). El efecto de las hormonas tiroideas en la eritropoyesis es debido a la estimulación de la tasa metabólica y consumo de oxígeno. Los andrógenos incrementan la producción de eritropoyetina, a la vez que mejoran la respuesta medular a la misma. Los estrógenos y el exceso de glucagón la deprimen (Feldman y col., 2000). Como se mencionó, el incremento de la eritropoyesis tiene una acción más retardada. El estímulo fundamental para la eritropoyesis es la hipoxia tisular, frente a la cual el riñón responde elaborando EPO (Nuñez Ochoa, 2007, Mira, 2015).

La médula ósea puede producir la expansión o la contracción de la masa de células rojas respondiendo a las necesidades de oxígeno del animal, pero éste es un mecanismo lento que no permite un ajuste rápido de las demandas. Por tal motivo existen mecanismos fisiológicos de acción corta que pueden responder a una disminución en la tensión de oxígeno (Meder, 2012). Estos mecanismos rápidos están dados por la liberación de glóbulos rojos maduros del pool de reserva del bazo, la liberación de reticulocitos del pool de reserva de la médula ósea, la respuesta vascular a la hipoxia con desvío del flujo sanguíneo desde los órganos menos comprometidos (desde los órganos que en el momento no están en su máxima actividad o en caso de pérdida de sangre a los órganos vitales) y la desviación de la curva de disociación de la hemoglobina, que incrementa la disponibilidad de oxígeno a los tejidos (Schalm's, 2010, Mira, 2015).

4.1.2 Metabolismo de la hemoglobina

La síntesis de hemoglobina comienza en el pronormoblasto y va incrementándose a medida que va madurando la serie roja, siendo mínima en la etapa basófila, moderada en la etapa policromatófila y marcada luego de la desnucleación, continuando hasta la maduración total del glóbulo rojo. La hemoglobina es una proteína tetramérica, cuya molécula está constituida por cuatro grupos hemo cada uno de los cuales está asociado a una cadena de polipéptidos. La función de esta molécula es el transporte de oxígeno hacia los tejidos (Schalm's, 2010). Fisiológicamente, cuando el glóbulo rojo envejece se condensa, se produce una disminución del tamaño, que es debido a la pérdida de enzimas glucolíticas. Estos glóbulos rojos son fagocitados por el sistema retículo endotelial (SRE) del bazo principalmente, del hígado y médula ósea. Una pequeña proporción puede lisarse en la circulación. En el SRE es separado el grupo Hemo de la globina la que va al pool de reserva de aminoácidos. Cada grupo Hemo se separa en sus componentes: el hierro y la protoporfirina (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 a).

El hierro es reciclado para ser usado por la médula ósea en la nueva síntesis de glóbulos rojos. Es conservado y almacenado como ferritina y hemosiderina en los macrófagos y puede ser liberado hacia la circulación y transportado unido a la transferrina. La protoporfirina es metabolizada y transformada por el SRE a bilirrubina indirecta o no conjugada. Esta es liberada a la sangre donde se une a la albúmina para ser transportada hasta el hígado donde es conjugada con el ácido glucurónico pasando a ser bilirrubina directa o conjugada. A su vez, ésta pasa al intestino y por acción de la flora bacteriana es transformada en estercobilinógeno, parte de éste se elimina por heces como estercobilina y otra parte cumple el ciclo enterohepático volviendo al hígado y eliminándose parte de él por orina como urobilinógeno (Cunningham, 2003)

4.2- ANEMIA EN FELINOS

La anemia puede ser definida como la situación en que la masa total eritroide en sangre periférica se encuentra debajo de los valores de referencia para un paciente teniendo en cuenta el género, la edad y la raza, con la consecuente disminución en la habilidad de oxigenar los tejidos adecuadamente. Valores disminuidos en la concentración de hemoglobina, hematocrito (volumen globular), y/o número total de eritrocitos en un animal con hidratación normal son las tres variables que permiten determinar el cuadro de anemia (Mills, 2000; Villiers, 2009, Miller y col.2009).

En felinos existe una mayor predisposición para presentar anemias debido a ciertas particularidades relacionadas con la especie (Gruffydd-Jones, 2011). En este sentido, el tiempo de supervivencia de los eritrocitos de gatos es más corto que en otras especies (70 a 78 días en gatos vs 110 días en perro). Asimismo, los felinos presentan un menor volumen sanguíneo (6 a 7 % del peso corporal en gatos vs 8 a 9 % en perro) (Villiers, 2009). Otra particularidad en los felinos es que la hemoglobina es más sensible a la oxidación, por presentar más grupos sulfidrilos por molécula (8 a 10 en gatos vs 2 a 4 grupos presentes en otras especies), lo que lleva a la formación de cuerpos de Heinz (Villiers, 2009).

4.3- CLASIFICACIÓN DE LAS ANEMIAS

Existen varias formas de clasificar las anemias, una es de acuerdo al tamaño del eritrocito y a la concentración de hemoglobina, otra forma es de acuerdo al mecanismo fisiopatológico que la produce, pero una de las más utilizadas en la bibliografía es según la respuesta de la médula ósea (Villiers, 2009).

La clasificación basada en tamaño celular las agrupa en normocítica, macrocítica, y microcítica, mientras que de acuerdo a la concentración de hemoglobina en anemia hipocrómica y normocrómica (Harvey, 2012). Los mecanismos fisiopatológicos pueden estar relacionados a una pérdida de sangre (hemorragias agudas o crónicas), debido a la destrucción de los eritrocitos (hemólisis) o por deficiencia de la producción en la médula ósea. Como se mencionó la clasificación más utilizada, es la que determina si la

respuesta de la médula ósea frente a la presencia de anemias es adecuada o no, es decir, anemias regenerativas o anemias no regenerativas. Las anemias regenerativas tienen una función medular normal teniendo entonces que haber sido causadas por la pérdida de sangre hacia afuera del organismo (hemorragia externa) o destrucción de eritrocitos dentro del organismo (hemólisis o hemorragia interna). Las anemias no regenerativas se caracterizan por la disminución o ineficiente producción de eritrocitos por la médula ósea, causadas en general por afecciones primarias o más comúnmente secundarias de la médula ósea (Mills, 2000)

4.4- ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGÍA

La anemia es la manifestación clínica de una enfermedad subyacente, no es un diagnóstico. La causa de la anemia se determina valorando la historia clínica del paciente, el examen clínico y los resultados de los exámenes de laboratorio. Conocer la causa específica de la anemia es importante para instaurar el tratamiento y emitir un pronóstico (Tvedten y Weiss 2000).

La clasificación de la anemia acorde al mecanismo fisiopatológico es de utilidad para llegar al diagnóstico de la probable causa (Gleich y Hartmann, 2009).

4.4.1 ANEMIAS REGENERATIVAS

La anemia puede considerarse regenerativa cuando la médula ósea puede responder en forma adecuada frente a una disminución en el número de eritrocitos y liberar células jóvenes a la circulación periférica (Giger, 2005). En esta forma de anemia suele haber aumento de eritropoyetina, la producción de glóbulos rojos se acelera y da como resultado la liberación de reticulocitos al torrente sanguíneo. Las dos posibles causas son la pérdida de sangre o la hemólisis. Existen algunas excepciones en los casos agudos de anemia debido hemorragia o destrucción de eritrocitos en los que la anemia inicialmente (24 a 48 horas) es no regenerativa. Frente a una hemólisis la respuesta regenerativa es importante mientras que en una pérdida de sangre la respuesta generalmente es moderada (Fleischman, 2012). En ambos casos luego de 3 a 4 días es posible ver signos de regeneración en sangre periférica debido al tiempo que lleva la formación de nuevos eritrocitos.

4.4.1a Anemias por pérdida de sangre

- Hemorragias agudas

Las principales causas de anemia por pérdida de sangre aguda pueden derivar de traumatismo, parásitos, coagulopatías, neoplasias, úlceras gastrointestinales, anomalías vasculares, roturas de vasos sanguíneos en cirugías, hematuria severa (Harvey, 2012). En general, en las hemorragias agudas el hematocrito está normal ya que hay pérdida de ambos componentes, plasma y eritrocitos. En algunas horas el hematocrito y las proteínas plasmáticas van a disminuir debido a la hemodilución resultante del movimiento del fluido intersticial hacia dentro de los vasos sanguíneos. En perros y gatos a las 48 a 96 horas aparecerán reticulocitos. Los síntomas clínicos cuando la pérdida es mayor al 20% del volumen sanguíneo total generalmente están asociados a

alteraciones cardiovasculares (vasoconstricción periférica, taquicardia, hipotensión y colapso cardiovascular).

El tratamiento de este tipo de anemia incluye la reposición de fluidos, prevenir la continuidad de la hemorragia, transfusiones y tratamiento de la causa primaria, (Giger, 2005).

- Hemorragias crónicas

Las hemorragias crónicas, conducen inicialmente a una anemia regenerativa, pero a medida que progresa se torna no regenerativa (por carencia de hierro o inflamación concomitante) por eso se verá con más detalle en las causas de anemia no regenerativa.

4.4.1b Anemias hemolíticas

Las anemias hemolíticas ocurren debido a un aumento de la destrucción de eritrocitos. La hemólisis puede ser clasificada en intravascular o extravascular; pudiéndose dar una u otra o la combinación de las dos formas. La hemólisis intravascular ocurre cuando los eritrocitos sufren lisis en la circulación; en cambio en la extravascular, los eritrocitos son removidos de la circulación por el sistema fagocítico mononuclear (bazo e hígado) con la posterior lisis (Fleischman, 2012). Existen muchas causas de hemólisis, las más importantes son la anemia hemolítica inmunomediada (IMHA) primaria o secundaria, anemia por cuerpos de Heinz por daño oxidativo (paracetamol), por causas infecciosas (*Mycoplasma haemofelis*, *VLLeF*), anemia hemolítica microangiopática (hemangiosarcoma), por defectos heredados de los eritrocitos, por hipofosfatemia grave, entre otras (Villiers, 2009; Stockol, 2010). Los animales con anemia hemolítica tienen signos clínicos generales de anemia (palidez de mucosas y adelgazamiento) conjuntamente con signos de hemólisis (ictericia, hemoglobinuria) Las anemias hemolíticas suelen estar asociadas a la producción acelerada de eritrocitos, ocurriendo hiperplasia de la médula ósea en perros y gatos, al igual que en humanos, alcanzando una tasa de producción 6 a 8 veces mayor a lo normal, (Giger, 2005).

4.4.2- ANEMIA NO REGENERATIVA O ARREGENERATIVA

La anemia no regenerativa resulta de una reducción de la producción de eritrocitos, debido a la incapacidad de la médula ósea para responder adecuadamente. En la clínica diaria a diferencia de lo observado en caninos, la anemia no regenerativa es la de más frecuente presentación en el gato (Couto y Nelson, 2014). Se desconoce la razón de la alta prevalencia de las anemias no regenerativas en felinos, pero se piensa que las enfermedades crónicas padecidas frecuentemente por los gatos contribuyan al desarrollo de este tipo de anemia (Lynch, 2016). En general, la mayoría de las anemias no regenerativas son crónicas, lo que permite una adaptación fisiológica por parte del animal a la disminución de hematíes (Couto y Nelson, 2014).

Hay varias causas de anemia no regenerativa como las enfermedades sistémicas que tienen efectos secundarios sobre la médula y las enfermedades primarias. Desde el punto de vista de la patogénesis, los mecanismos principales que conducen a una

anemia no regenerativa en felinos son la eritropoyesis disminuida y/o ineficaz y la disminución de la vida útil de los eritrocitos maduros en circulación. Las principales patologías que causan anemia no regenerativa por eritropoyesis disminuida o ineficaz están relacionadas con los procesos inflamatorios crónicos, enfermedades infecciosas (VIF y ViLeF), procesos endócrinos, deficiencia de hierro (menos común por Vitamina B12) y desórdenes de la médula ósea. En menor medida, la principal etiología que da como resultado la disminución de la vida útil de los glóbulos rojos son algunas anemias hemolíticas inmunomediadas (White y Reine, 2009). En general, los trastornos que provocan disminución de la vida útil de los eritrocitos causan anemia regenerativa en gatos, aunque en algunas excepciones se puede observar anemia no regenerativa. Los desórdenes primarios de la médula ósea conducen a una anemia de moderada a grave (Hto < 20 %), mientras que las anemias por enfermedad crónica o secundarias son de leves a moderadas (Villiers, 2009).

4.4.2a Anemias no regenerativas a consecuencia enfermedades sistémicas que impactan secundariamente en la médula ósea

Anemia por Inflamación Crónica

Las anemias no regenerativas se dan secundariamente a desórdenes inflamatorios cuando existen infecciones, traumatismo de hueso o de tejidos blandos, inflamación inmunomediada o necrosis tisular asociada con neoplasia (White y Reine, 2009). Es una causa común de generación de anemias en felinos y si bien es de evolución crónica, suele desarrollarse bastante rápido (en el transcurso de 10 días). La anemia es de ligera a moderada (Hto entre 19-26 %), la manifestación clínica es leve y los pacientes son evaluados por la alteración primaria como por ejemplo un tumor o un proceso inflamatorio (Couto y Nelson, 2014). La patogénesis es multifactorial y puede ser debida al estrés inducido por la liberación de citoquinas en respuesta a la agresión celular que causa la infección, inflamación o neoplasia (Chikazawa, 2016)

La hepcidina (proteína de fase aguda tipo 2) producida en el hígado, cuya síntesis es inducida por la interleucina-6 (producida tempranamente como respuesta a un estímulo inflamatorio) es un mediador clave en la patogénesis de este tipo de anemia. La hepcidina inhibe la salida de hierro de los macrófagos y los enterocitos duodenales, dando como consecuencia una reducción de absorción del hierro y un depósito de hierro en los macrófagos (Schalm's, 2010). La menor circulación en sangre resulta en una menor disposición de hierro y se cree que es un mecanismo de protección al privar a los agentes infecciosos de hierro, pero en contraposición disminuye la eritropoyesis al faltar este componente (White y Reine, 2009). Esta falta de disponibilidad de hierro está mediada por la lactoferrina (glicoproteína que se une al hierro y actúa en la regulación del sistema inmune) y otros reactivos de fase aguda liberados por los neutrófilos en un proceso inflamatorio (Couto y Nelson, 2014). Otra de las causas de disminución de eritropoyesis es la inadecuada secreción de la eritropoyetina con respecto al grado de anemia que sumado a la disminución de la respuesta de la médula ósea por acción de ciertas citoquinas (factor de necrosis tumoral e interleucina 1) contribuyen a la producción de anemia no regenerativa (Tasker, 2012).

Anemia por deficiencia de hierro

Este tipo de anemias generalmente se relacionan a la pérdida de sangre crónica en el gato debido a pérdidas gastrointestinales, exceso de ecto y endoparásitos y en menor frecuencia hematurias crónicas. La frecuencia de aparición es mayor en animales jóvenes debido a que tienen menor cantidad de hierro almacenado (Villiers, 2009). En muy raras ocasiones se puede deber a una deficiencia nutricional, ocurriendo en neonatos en donde la leche sea pobre en hierro (White y Reine, 2009).

En las pérdidas crónicas de sangre, las reservas de hierro se van agotando debido a que la médula ósea debe compensar en forma continua el déficit; se va perdiendo el hierro del grupo hemo, produciéndose una hemoglobinización. La mayoría del hierro se encuentra en la hemoglobina (65%), un pequeño porcentaje (5%) se encuentra en la mioglobina, enzimas o unido a la transferrina (molécula de transporte) y el resto almacenado en los tejidos como hemosiderina y ferritina. Debido a que el hierro se utiliza para la eritropoyesis, se comienzan a utilizar las reservas almacenadas y al irse agotando se produce la deficiencia de hierro (Gest y col. 2015). Resulta difícil muchas veces diferenciar si la causa de la anemia es por inflamación o por carencia de hierro y en muchas ocasiones pueden coexistir (Winzelberg, 2019).

Anemia por enfermedad renal crónica

Es una patología común en los felinos y la gravedad de la anemia está directamente relacionada con la gravedad de la falla renal (Thrall, 2012; Winzelberg, 2019). Como ya se mencionó, el riñón es el principal órgano de producción de eritropoyetina y en la enfermedad renal crónica esta proteína se encuentra disminuída siendo la principal causa de anemia. A esto se puede sumar las hemorragias clínicas o subclínicas que presentan estos pacientes por úlceras en el aparato digestivo y la elevación de hormonas paratiroideas que también disminuyen la eritropoyesis (Couto y Nelson, 2014). La uremia causa disminución del tiempo de supervivencia de los eritrocitos y tiene efectos supresores de sobre la médula ósea lo que contribuye a la producción de anemia (White y Reine, 2009; Chalhoub y col., 2011).

Anemia por insuficiencia hormonal

La anemia frecuentemente acompaña las patologías endócrinas que afectan la tiroides, las glándulas adrenales, paratiroides, hipófisis y gónadas. Estas anemias en general son de baja intensidad y asintomáticas

Anemia por insuficiencia hepática

La anemia normocítica, normocrómica no regenerativa es un hallazgo común en las enfermedades hepáticas. Intervienen varios mecanismos para la generación de anemia como son, la disminución del metabolismo de las proteínas, la disminución de la supervivencia de los glóbulos rojos (se reduce la vida media de los glóbulos rojos) y la eritropoyesis reducida (Michelle, 2004). Puede existir una anemia regenerativa secundaria a las pérdidas de sangre por anomalías de la coagulación o hemorragia gastrointestinal (Zawie y col, 1984). Se observa comúnmente anemia no regenerativa,

en gatos con lipidosis hepática y puede producirse leucocitosis por estrés. En las colangiohepatitis, los hallazgos hematológicos son a menudo normales; sin embargo, aproximadamente del 25% al 30% de los casos agudos tienen neutrofilia con un desplazamiento leve hacia la izquierda y puede haber anemia leve no regenerativa asociada a una enfermedad crónica por el secuestro de hierro (Michelle, 2004).

Anemia por enfermedades infecciosas

Si bien existen muchas causas infecciosas de anemia no regenerativa, las más frecuentes son las de origen viral provocadas por VIF y ViLeF (Winzelberg, 2019). La prevalencia global de las infecciones por ViLeF se sitúan en un entorno del 2.3% y la de VIF en 2.5% (Elder y col., 2010, Sykes, 2014). Si bien en Uruguay no hay datos publicados al respecto, en un estudio de positividad a estos virus en muestras remitidas al Laboratorio de Análisis Clínicos, Facultad de Veterinaria, UdelaR en el periodo comprendido entre los años 2019-2022, fueron positivas a VIF el 23.5% (141/601) y a ViLeF el 20.5% (127/620), (datos no publicados, Lindiman, 2023; Anexo I).

Ambas infecciones son causadas por retrovirus que provocan anemia, síndromes de inmunodeficiencia, signos neurológicos y neoplasias (Sykes, 2014). A nivel hematológico, el ViLeF provoca anemias, neutropenia, trombocitopenia, anormalidades de la función de las plaquetas, mielosupresión (anemia aplásica o pancitopenia), síndromes mielodisplásicos, neoplasias (leucemia o linfoma) o anemia hemolítica secundaria (White y Reine, 2009; Hartmann, 2011). La más común es la anemia no regenerativa causada por el efecto supresor del virus en la médula ósea por infectar las células hematopoyéticas (Harmann, 2012).

En la infección por VIF, las citopenias causadas por la supresión de la médula ósea son poco frecuentes, observándose anemia y neutropenia leves, siendo la más común la linfopenia (Gleich y col., 2009). El VIF afecta principalmente linfocitos T CD4+, causando una disminución de los mismos, aunque también puede infectar linfocitos T CD8+ y otros tipos celulares. La patogénesis de estos cambios en gatos con VIF es similar a la causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que se ha convertido en un modelo bien establecido para la inmunopatogénesis de esa enfermedad en humanos (Burkhard, 2003). En la fase aguda de la infección con VIF hay una disminución de las células T CD4+ y CD8+ en la sangre periférica y ocurre la activación de las células T reguladoras (Treg) CD4+/CD25+. Estas células reguladoras luego inhiben la proliferación de células T CD4+ y CD8+ activadas y provocan que experimenten apoptosis (Sykes, 2014). A medida que progresa la infección se produce una reducción en el número de linfocitos T CD4+ que se destruyen y la activación de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, lo que lleva a la inversión de la tasa CD4+/CD8+ que provoca linfopenia. (Colado y Pérez, 2010). Del mismo modo se ha reportado que animales infectados por ViLeF presentan el mismo comportamiento en esta subpoblación linfocitaria (Hofmann-Fezer y col., 1996).

4.4.2b Anemias no regenerativas por alteraciones primarias de la médula ósea

Las causas más importantes de anormalidades en médula ósea son la anemia aplásica, aplasia eritrocitaria pura, la leucemia, mieloptosis, mielofibrosis, síndromes mielodisplásicos (SMD). En todas estas alteraciones se produce una anemia grave y

también se pueden ver afectadas las otras líneas celulares o la presencia de células atípicas (Villiers, 2009).

Anemia aplásica

Es una alteración que se caracteriza por citopenias de más de una línea celular, producto del daño en las células precursoras o al microambiente de la médula, llevando al fallo de médula ósea (Villiers, 2009; Couto y Nelson, 2014). Cuando se produce el daño de las células progenitoras y de las células en división produce una leucopenia, neutropenia y trombocitopenia en un período de 5 a 10 días. La anemia se instala en forma más tardía, debido a la mayor sobrevivencia de los eritrocitos. Esta anemia está asociada en los felinos a la administración en los fármacos como griseofulvina, cloranfenicol, corticoides, enfermedades infecciosas por ViLeF, mecanismos inmunomediados o idiopáticos. Los aspirados de médula ósea muestran hipocelularidad o acelularidad (Weiss, 2006; Couto y Nelson, 2014).

Anemia eritrocitaria pura

En esta condición se produce una disminución de la serie roja por destrucción de los precursores eritroides, produciéndose una anemia no regenerativa grave, sin afectar al resto de las líneas celulares. Puede ser primaria o secundaria, en la forma primaria se ven afectados los precursores eritroides tempranos. La aspiración de la médula ósea revela una ausencia de células eritroides o un número muy bajo de células eritroides más inmaduras (primeros precursores), los precursores granulocíticos, monocíticos y trombocíticos se encuentran normales o aumentados, los linfocitos y plasmocitos pueden estar incrementados (Villiers, 2009). La forma secundaria se produce por el uso de Eritropoyetina recombinante humana o asociados a infección por ViLeF subgrupo C (Schalm's, 2010). En el caso de infecciones causadas por ViLeF, no se produce un aumento de linfocitos en médula ósea (Villiers, 2009).

Leucemia

La leucemia es cuando las células hematopoyéticas de una línea celular se vuelven neoplásicas, se produce una expansión clonal de la línea afectada y se libera un elevado número de células neoplásicas a la circulación periférica. Se produce una supresión de la hematopoyesis normal, además las células neoplásicas compiten por los nutrientes y producen sustancias que inhiben la función normal de la médula. En el examen de sangre periférica se puede observar anemia, neutropenia y trombocitopenia, junto con células atípicas (leucémicas), (Villiers, 2009).

Mieloptosis

La mieloptosis es la infiltración de la médula ósea con células neoplásicas que no son hematopoyéticas, como pueden ser las metástasis de carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas (Villiers, 2009) o granulomatosas (*Histoplasma capsulatum*, *Mycoplasma* spp.) (Couto y Nelson, 2014). La infiltración de la médula ósea con células neoplásicas o inflamatorias puede llevar al desplazamiento de los precursores hematopoyéticos normales y provocar el desarrollo de citopenias en sangre periférica, la disminución es de todas las líneas celulares (Couto y Nelson, 2014).

Mielofibrosis, osteoesclerosis y osteopetrosis

En la mielofibrosis el tejido hematopoyético es sustituido por fibroblastos, fibras de reticulina y de colágeno, este depósito de tejido fibroso hace que la hematopoyesis se encuentre disminuida, principalmente en la eritropoyesis dando una anemia no regenerativa, que en algunas ocasiones se acompaña de trombocitopenia y rara vez de leucopenia (Villers, 2009). Los fibroblastos y los osteoclastos del interior de la médula ósea pueden proliferar como respuesta a infecciones retrovirales, estímulos nocivos crónicos o causas desconocidas, provocando un relleno óseo o fibroso de la cavidad y desplazando a los precursores hematopoyéticos. Estas formas patológicas son raras de ver, pero se han observado en gatos infectados con ViLeF (Couto y Nelson, 2014). En la mayoría de los casos la mielofibrosis se produce en forma secundaria por una causa subyacente como por ejemplo la aplasia eritrocitaria pura, las neoplasias en la médula intra o extramedulares, daño tóxico de la médula, entre otros.

En los hemogramas se puede observar anemia no regenerativa grave, algunas veces trombocitopenia y rara vez leucopenia. En la aspiración de la médula ósea se puede extraer una muestra seca, siendo necesario para el diagnóstico una biopsia de corazón de la médula (Raskin 1989).

Síndromes mielodisplásicos (SMD)

Son un grupo de enfermedades en el que se produce un desarrollo anormal de los precursores, alterándose la normalidad de las células y dando cambios displásicos (atípicos) en las líneas celulares. Si bien se ha reportado SMD en perros y gatos, es más frecuente en esta última especie cuando son afectados por retrovirus (Couto y Nelson, 2014). La mayoría de los casos sucede como consecuencia de una infección por ViLeF y en forma secundaria la causa puede ser un linfoma, mielofibrosis, fármacos (Villers, 2009). En la anemia por SMD refractarios, la línea eritroide se vuelve displásica y en sangre periférica se observan citopenias aisladas o combinadas, macrocitosis, metarrubricitos, reticulocitopenia y macrotrombocitosis. Los cambios citomorfológicos en médula ósea, son celularidad normal o aumentada, menos de un 30% de blastos, relación mieloides/eritroides aumentado, diseritropoyesis, dismielopoyesis y distrombopoyesis. Son frecuentes los precursores megaloblásticos de hematíes, con rubricitos o metarrubricitos ocasionales binucleados, trinucleados o tetranucleados. Las anomalías de la línea mieloides son metamielocitos gigantes y una maduración nucleocitoplasmática asincrónica (Couto y Nelson, 2014). En una tercera parte de los gatos con SMD, se desarrolla una leucemia aguda semanas o meses después del diagnóstico, en humanos los SMD progresan a leucemias mieloides agudas (LMA) y sólo casos aislados lo hacen hacia una leucemia linfocítica (LLA), en gatos se ha observado el desarrollo a una LLA en gatos que son virémicos para ViLeF (Couto y Nelson, 2014).

4.5- ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LAS CAUSAS DE ANEMIAS

Las anemias constituyen un estado clínico que se aborda como un proceso secundario, por lo tanto, forma parte de una entidad primaria que es lo que el clínico debe diagnosticar. La evaluación de las alteraciones eritrocitarias y los cambios funcionales requiere diversas pruebas de laboratorio. Dentro de éstas el hemograma con énfasis en la morfología eritrocitaria, con conteo de plaquetas, conteo de reticulocitos, cálculo de los índices hematimétricos y recientemente la evaluación del ancho de distribución de los globulos rojos es esencial (Mills, 2000; Couto 2003).

4.5.1 Datos Anamnésticos

Dentro de los datos anamnésticos es relevante conocer el estado sanitario, frecuencia de desparasitaciones internas y externas, vacunaciones, alimentación, lugar donde vive el felino (indoor/outdoor), si cohabita con otros gatos y si ha presentado algún síntoma como vómitos, orina o materias fecales con sangre, si tiene antecedentes médicos, administración de fármaco o ha estado en contacto con tóxicos (Couto y Nelson, 2014).

4.5.2 Signos clínicos en el paciente anémico

Los signos clínicos en un paciente con anemia son membranas mucosas pálidas o ictéricas, disminución de la actividad general (intolerancia al ejercicio y letargia), pérdida ponderal, anorexia, pica. Otros signos que pueden visualizarse son petequias y equimosis en las mucosas, linfadenopatías, taquicardia, soplo cardíaco, disnea, hematuria, sangrado en heces, cambios de comportamiento. Los gatos en la mayoría de los casos presentan manifestaciones clínicas tardías (crónicas) debido a que compensan mediante el desplazamiento a la derecha de la curva de disociación de oxihemoglobina, liberando más rápidamente el oxígeno de los tejidos. Es por ello que los gatos anémicos se mantienen estables hasta que el hematocrito disminuye a valores significativos y los signos se agudizan (Couto y Nelson, 2014).

4.5.3 Hemograma

El hemograma es un estudio sencillo que nos aporta una gran cantidad de información sobre el estado de salud del paciente. Es la prueba de elección para confirmar un estado anémico. El primer dato que debemos observar es el hematocrito que confirmará la anemia y nos orientará de la gravedad de la misma. Los índices hematimétricos, como el volumen corpuscular medio (VCM) y la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) son de gran importancia ya que brindan información sobre el tamaño y la concentración de hemoglobina de los hematíes respectivamente. Otro parámetro a evaluar es el ancho de distribución normal de los eritrocitos (RDW) (Villiers, 2009).

El examen del frontis sanguíneo, teñido con Wright, proporciona información de la anemia al visualizar la morfología existente; se pueden ver anisocitosis, cantidades variables de policromatófilos, macrocitos, eritrocitos hipocrómicos, células atípicas, además de observar la línea blanca y las plaquetas. La anemia no regenerativa comúnmente es normocítica (VCM normal) y normocrómica (CHCM normal) y homogénea en volumen celular (RDW normal). Esto suele observarse en las anemias

causadas por enfermedad renal crónica, enfermedad inflamatoria, insuficiencia hepática, anemia aplásica, anemia eritrocitaria pura, disturbios mieloproliferativos, y en ocasiones en el ViLeF. Con menor frecuencia, en los casos de anemia no regenerativa por deficiencia de hierro esta suele ser microcítica (VCM bajo), normocrómica (CHCM normal) y heterogénea en el volumen celular (RDW alto) y no típicamente microcítica e hipocrómica como ocurre en el perro (Cowell y col., 2010). Cuando las anemias no regenerativas son macrocíticas (VCM alto) y normocrómica (CHCM normal) por lo regular se debe de sospechar de una infección por ViLeF donde hay supresión de la médula ósea, acompañada o no por desórdenes mieloproliferativos o por leucemia linfocítica y en infecciones por VIF. Si bien la evaluación del VCM, CHCM y la presencia o ausencia de policromatófilos, así como la anisocitosis nos puede orientar a diferenciar una anemia regenerativa de una no regenerativa, la forma más precisa de evaluar la respuesta de la médula ósea es midiendo el recuento de reticulocitos (Willard y Tvedten, 2004).

4.5.4 Recuento de Reticulocitos

Recuento manual de reticulocitos

El reticulocito es un eritrocito joven, carente de núcleo pero que conserva en el interior de su citoplasma grandes cantidades de ARN de los precursores de los que procede.

Para poder visualizar los reticulocitos en un frotis sanguíneo, es necesario utilizar tinciones supravitales (tinción de células vivas) como el nuevo azul de metileno o el azul de cresilo. Al precipitar el colorante con el ARN, tiñen la red de retículos de los ribosomas agregados, las mitocondrias y los organelos presentes en los eritrocitos inmaduros quienes van a ser contados al microscopio. Debido a que al ir madurando los reticulocitos se va perdiendo la red de retículos la muestra debe ser lo más fresca posible y preferentemente se debe evaluar antes de las 6 horas de extraída la muestra (Villiers, 2009). Cabe señalar que los gatos presentan dos tipos de reticulocitos: los agregatas y los punctatas. Los reticulocitos agregata circulan por un período corto de tiempo (aproximadamente 12 hrs) antes de convertirse en reticulocitos punctata los cuales se transforman en eritrocitos maduros después de 10 días. Por eso, cuando existen reticulocitos agregata en la circulación está asociado a una respuesta regenerativa reciente y en el caso de los punctata a una respuesta tardía (Villiers, 2009).

En el conteo de reticulocitos, solo se considerará el recuento los agregatas, que contienen grumos oscuros medianos a grandes en contraste con los punctata en los que se ven grumos diminutos como puntos (Figura 3).

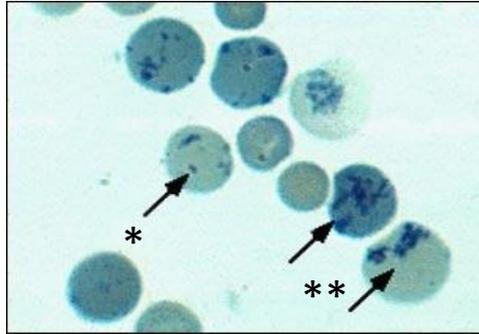


Figura 3. Reticulocitos *punctata* (*) y *aggregatas* (**). Tomado de <http://articulos.sld.cu/hematologia/archives/195>.

En sangre de un animal sano, existe un número pequeño de reticulocitos (<1.0 %), pero el valor obtenido es afectado por las variaciones en el número de eritrocitos, por eso siempre debemos utilizar el recuento absoluto de reticulocitos. Este valor absoluto se obtiene de multiplicar el porcentaje de reticulocitos no corregido como decimal por el recuento de glóbulos rojos del felino (Fleischman, 2012). Cuando el recuento de reticulocitos es $< 60 \times 10^9/l$ se interpreta que no hay respuesta regenerativa (tomado de Cornell University College of Veterinary Medicine, 2013 a).

Recuento automatizado

El conteo de reticulocitos se realiza también en forma automatizada utilizando la citometría de flujo acompañadas de diferentes tinciones fluorescentes como el orange thiazole, azul de metileno u orange de acridina entre otros. Estos colorantes se unen específicamente a ácidos nucleicos remanentes en los reticulocitos.

4.6- ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE CAUSAS DE ANEMIA

4.6.1 Pruebas de bioquímica sérica

- Perfil renal: evalúa urea, creatinina y fósforo, si estos valores están alterados estamos frente a una disminución del volumen de filtración glomerular, en consecuencia, el aumento de urea, creatinina y fósforo son indicadores de que la anemia no regenerativa probablemente tenga su origen en una falla renal crónica.

-Perfil hepático: transaminasa glutámica oxalacético (GOT), transaminasa glutámico pirúvico (GPT), fosfatasa alcalina (FAS) gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), albúminas, globulinas, proteínas totales, colesterol, bilirrubina total (directa e indirecta). Si tenemos bilirrubina directa mayor que la indirecta y tenemos un aumento de las enzimas hepáticas, se debe de considerar la enfermedad hepática como causante de supresión de la médula ósea.

-Hierro sérico y ferritina sérica: ya sea que la deficiencia de hierro sea funcional o absoluta, puede desarrollarse anemia, porque el hierro no está disponible para la eritropoyesis. La anemia puede exacerbarse aún más porque la inflamación aumenta la fagocitosis de los glóbulos rojos y disminuye la vida útil de los glóbulos rojos circulantes (De Domenico y col., 2007).

4.6.2 Urianálisis

Es muy útil para complementar la valoración del funcionamiento del riñón mediante la densidad y la presencia de proteínas. La isostenuria y el aumento de proteínas son parámetros que nos hacen sospechar de un funcionamiento anormal de este órgano. El estudio del sedimento nos puede revelar la presencia de cilindros o células tumorales, así como la hematuria como indicador de pérdida de sangre a través de la orina (Couto y Nelson, 2014).

4.6.3 Estudios Imagenológicos

Los hallazgos mediante el uso ecográfico y radiológicos frente a un estado anémico pueden ser: hepatomegalia, esplenomegalia, cardiomegalia, pseudohipertrofia del ventrículo izquierdo, adenomegalia, además puede visualizarse sangrado en abdomen o tórax, presencia de tumores (Couto y Nelson, 2014).

4.6.4 Estudios serológicos y de biología molecular

Los métodos serológicos, en particular los basados en la técnica de ELISA son los más utilizados para diagnosticar los retrovirus, son rápidos, sencillos y bastante fiables. Existen también kits diagnósticos basados en inmunocromatografía o inmunomigración rápida, muy utilizados por su practicidad y permiten la detección conjunta de VIF y ViLeF (anticuerpos del VIF y antígeno de ViLeF) (Arjona y col. 2006; Hartmann, 2012).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, es el método de elección para diagnosticar estos virus. En el caso de ViLeF esta prueba es utilizada para detectar ácidos nucleicos de ViLeF o provirus (ADN viral) o ácido ribonucleico viral (ARN) (Hartmann, 2012). El test se puede realizar en muestras de sangre (plasma o suero), tejidos, saliva, heces o de médula ósea. Es una prueba muy sensible y puede ser utilizada para confirmar estados de infecciones latentes cuando ya no hay replicación del virus (Hartmann, 2012). Altas concentraciones de ARN viral en sangre o saliva están asociados a infección en fase progresiva y bajas concentraciones se asocian con infección en fase latente (Sykes y Hartmann, 2013). Para el diagnóstico de VIF la PCR presenta una sensibilidad y especificidad más variable, el test es útil en casos en que el gato tenga el provirus, pero no haya producido anticuerpos contra el VIF (en infecciones recientes), cuando se debe de confirmar un test serológico positivo o en fases finales cuando la inmunidad está muy comprometida (Sellon y Hartmann, 2012).

4.7- EVALUACIÓN DE LA MEDULA ÓSEA (MIELOGRAMA)

Es el examen directo de células de la médula ósea recogidas mediante aspiración para verificar anormalidades de producción de células sanguíneas, alteraciones de aspecto celular y presencia de neoplasias (Aquino y col., 2002). Proporciona información sobre

la causa subyacente de anemia, contribuyendo a predecir el pronóstico y la evolución de la enfermedad.

4.7.1 Evaluación citológica de la médula ósea

El estudio de la citología de la médula ósea es una valiosa herramienta diagnóstica y pronóstica para la evaluación de alteraciones hematopoyéticas (Grindem, 2002). Se debe interpretar conjuntamente con los hallazgos encontrados en el hemograma realizado el mismo día de la toma de la muestra del aspirado medular. Para poder realizar una evaluación en forma correcta, debemos conocer las células normales que aparecen en la médula ósea: serie eritroide, granulocítica, monocítica, trombocítica, linfocítica y células plasmáticas, macrófagos, osteoclastos y osteoblastos, otras células (células grasas, endoteliales, fibrocitos/fibroblastos, mastocitos y núcleos libre), así como procesos patológicos como las neoplasias que infiltran la médula ósea, necrosis, displasias, eritrofagia, etc (Grindem, 2009; Cowell, 2010).

4.7.1a Serie eritroide

Cuando las células eritroides van madurando disminuyen de tamaño, los núcleos se condensan y el citoplasma vira de color azul oscuro a rojo anaranjado.

Rubiblasto

Es la célula identificable más inmadura, es grande, de forma redonda, el citoplasma azul oscuro de tamaño pequeño a moderado, el núcleo es grande, de cromatina granular densa y presenta de 1 a 2 nucléolos, en el gato se encuentra en un 0,5 % en la médula ósea.

Prorrubricito

Es una célula de mediana a grande, moderada cantidad de citoplasma azul medio a oscuro, el núcleo es de mediano a grande, con un patrón de cromatina gruesa y los nucléolos normalmente no son visibles, el porcentaje relativo es de 3,5 %.

Rubricito

Esta fase la célula es de tamaño mediano a pequeña y el citoplasma es de pequeña a moderada cantidad. Según el color de su citoplasma, se divide en rubricitos basófilos (azul), policromatófilico (azul-rosa) y ortocromático (naranja). El núcleo es de mediano a pequeño con cromatina grumosa y espacios claros, los nucléolos no son visibles y se encuentran en una proporción del 75 %.

Metarubricito

Es una célula pequeña de citoplasma azul-rosa (policromatófilico) o naranja (ortocromático), de núcleo pequeño y picnótico, cromatina grumosa con escasos o nulos espacios claros y nucléolos no visibles. Se encuentran en un 21 % en la médula ósea (Figura 4) (Grindem, 2009).

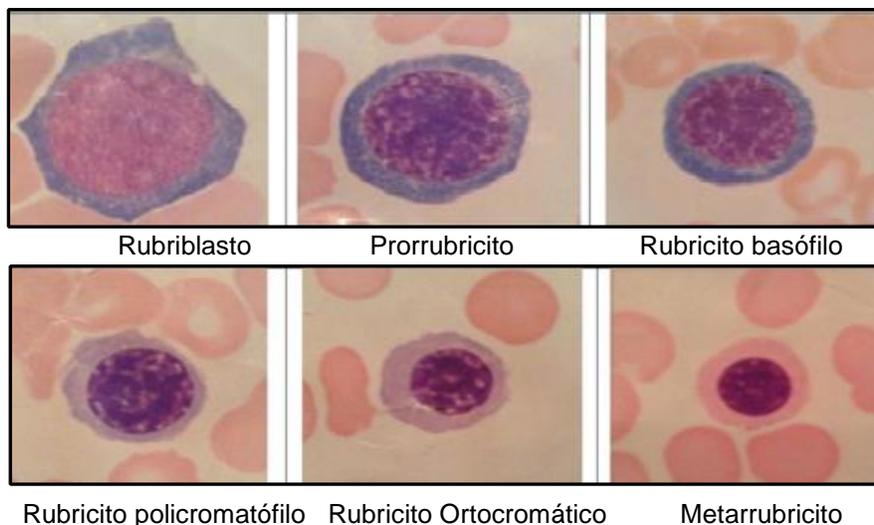


Figura 4. Eritropoyesis. Tomado de <https://images.app.goo.gl/L9AD4uoK7>.
4.7.1b Serie granulocítica o mieloide

Mieloblasto

Es grande, de forma redonda o irregular, de citoplasma medio, azul claro, sin gránulos. El núcleo es redondo con patrón de cromatina fino y entrelazado y nucléolos prominentes. Representan el 1 % del total de las células mieloides.

Promielocito

Es ligeramente de mayor tamaño que el mieloblasto debido a que su citoplasma es más grande, de color azul claro, con pequeños gránulos primarios diseminados de color rojo púrpura (azurófilos) inespecíficos, núcleo redondo a ovalado con patrón de cromatina gruesa y nucléolos indefinidos, el porcentaje relativo es de 3 %.

Mielocito

El citoplasma es color azul claro a trasparente y los gránulos primarios no son visibles y aparecen los secundarios (específicos) que le da a los eosinófilos y a los basófilos sus características, apreciándose desde claro hasta ligeramente granular, el núcleo es redondo a ovalado con ligera escotadura y patrón de cromatina gruesa. Es la última fase en la que se produce mitosis. Se encuentran en una proporción de un 10 %.

Metamielocito

Es una célula de citoplasma claro a ligeramente granular, el núcleo es de forma arriñonada de judía con un patrón de cromatina grueso con grumos. El porcentaje aproximado es de 20 %. A partir de esta fase, ya no se producen mitosis.

Neutrófilo en banda

El citoplasma es claro a ligeramente granular similar al metamielocito, el núcleo es en forma de bastón curvado o de banda, con bordes lisos, el patrón de cromatina es grueso con grumos densos. Se encuentra en una proporción de 30 %.

Neutrófilo segmentado

Es la fase final de los granulocitos (neutrófilo, eosinófilo o basófilo maduro), el citoplasma es claro a ligeramente granular, el núcleo tiene escotaduras marcadas y patrón de cromatina grueso con grumos densos. El porcentaje relativo es de 36 % (Grindem, 2009) (Figura 5).

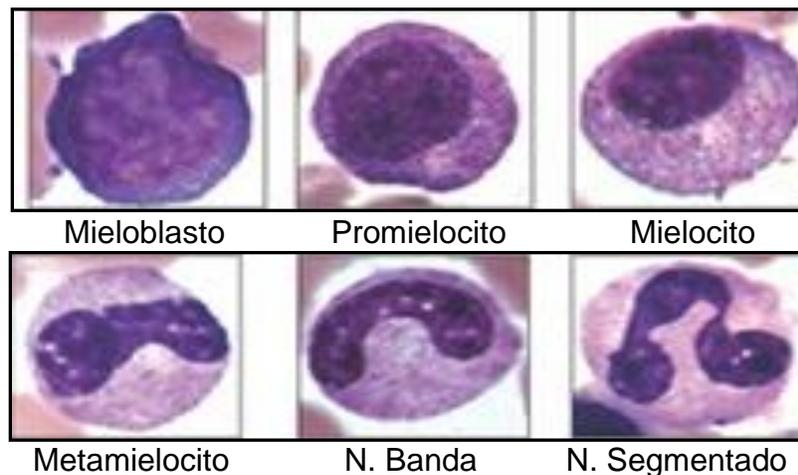


Figura 5. Granulopoyesis. Tomado de <https://images.app.goo.gl/FzYieJv39ZUtdMkQA>.

4.7.1c Serie monocítica

Representan un pequeño porcentaje del total de células de la médula ósea, las fases inmaduras son muy similares a las granulocíticas. Los monocitos maduros de la médula ósea son muy similares a los monocitos de sangre periférica.

Macrófagos

Son células grandes, pero no tanto como los precursores mieloides en etapas iniciales, de citoplasma claro con límites poco definidos, suele tener vacuolas o material fagocitado, el núcleo suele ser excéntrico y se encuentra en un porcentaje menor al 2 % en la médula ósea.

4.7.1d Serie trombocítica o megacariocítica

Megacarioblastos

Si bien esta fase inmadura se puede visualizar en los preparados citológicos, es difícil diferenciarlo de otras células blásticas y aparecen en muy pequeñas cantidades.

Promegacariocito

Son de tamaño mayor a las células inmaduras eritroides y mieloides, el citoplasma es azul profundo y presenta de 2 a 4 núcleos unidos por finas fibras de material nuclear.

Megacariocitos

Es la célula más grande que se visualiza en los extendidos citológicos de médula ósea (50-200 μm de diámetro), su citoplasma cuando es azul oscuro es indicador de que es inmaduro (megacariocito basófilo) y es más maduro cuando su citoplasma es azul claro con gránulos eosinófilos (megacariocito eosinófilo ogranular), contienen más de cuatro núcleos unidos formando una masa lobulada (Figura 6) (Grindem, 2009).

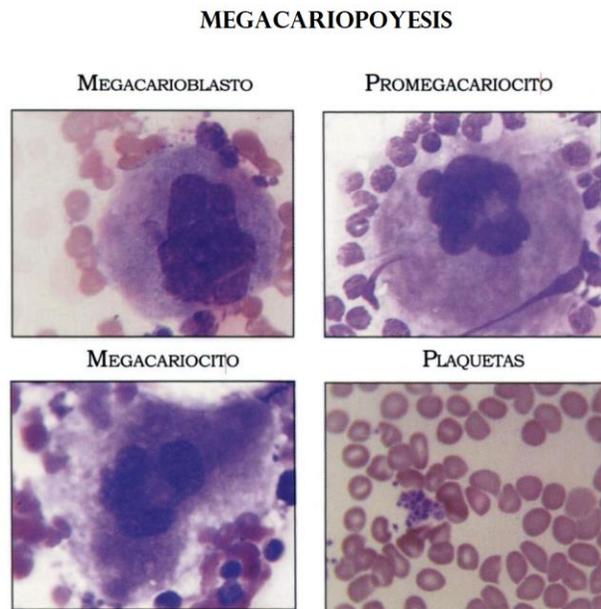


Figura 6. Megacariocitos. Adaptado de Manascero, A. (2003). Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas (Vol. I). Bogota: Pontificia Universidad Javeriana

4.7.1e Linfocitos y células plasmáticas

Los linfoblastos y prolinfocitos son linfocitos de citoplasma moderado y azul claro a oscuro, el núcleo puede ser escotado o irregular y el patrón de cromatina es reticular fina o entrelazada, pueden confundirse con las células inmaduras eritroides. En felinos se encuentran en una proporción menor al 10 %. Los linfocitos son de apariencia igual a los observados en sangre periférica (Figura 7).



Figura 7. Linfopoyesis. Tomado de <https://www.slideshare.net/diegowapo/linfopoyesis-16739313>

Las células plasmáticas (Figura 8) de tamaño mayor que un neutrófilo, de citoplasma moderado a abundante color azul profundo, el aparato de Golgi suele verse como una zona más clara adyacente al núcleo y a veces puede presentar estructuras redondas llamadas cuerpos de Russell (Células Mott), el núcleo es redondo y excéntrico. Se las puede encontrar en un porcentaje menor al 2%.

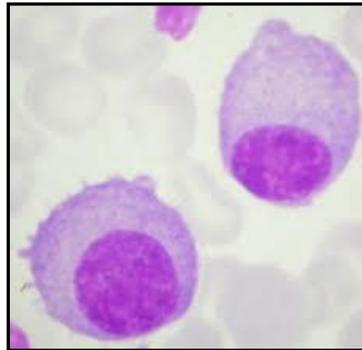


Figura 8. Célula plasmática. Tomado de Harvey, J.W. (2012)

4.7.1f Osteoclastos y osteoblastos

Los osteoclastos son células gigantes y se pueden confundir con megacariocitos, el citoplasma es de color azul y puede contener material granular azurófilo, contiene muchos núcleos claramente separados. Se ven en forma ocasional, con mayor frecuencia en animales jóvenes (Figura 9A). Los osteoblastos son similares a las células plasmáticas y se presentan con mayor frecuencia en animal de menor edad (Figura 9B) (Grindem, 2009).

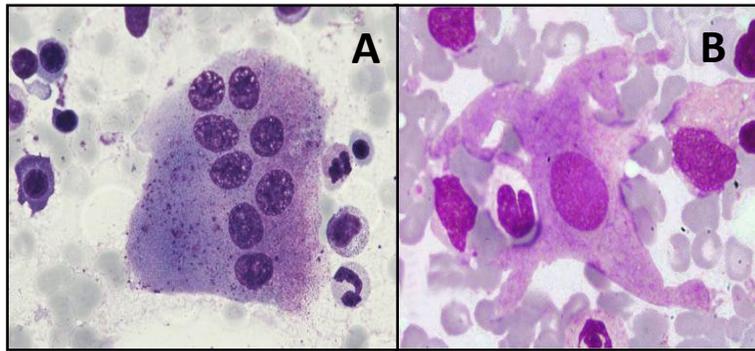


Figura 9. Osteoclasto (A) Tomado de A Iborra, MA Montañés, L Lacalle Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza y Osteoblasto (B) y Tomado de A. Domingo Claros Hospital Univeristari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona

4.8- ABORDAJE DIAGNOSTICO DE PATOLOGÍAS DE MÉDULA ÓSEA

4.8.1 Evaluación citológica

La evaluación citológica de la médula ósea debe ser metódica y minuciosa. Cuando realizamos el aspirado de médula ósea, comienza la evaluación en forma macroscópica. La obtención de pocas y pequeñas fibras en donde las extensiones son reducidas, rodeadas de zonas de diferentes tamaños sin teñir, sugieren una médula hipocelular, mientras que la obtención de muchas fibras medulares, donde se logra grandes extendidos teñidos de azul-púrpura, son indicativos de una médula normocelular o hiper celular, las zonas rojizas suelen indicar coágulos. Las muestras que obtienen pocas fibras o ninguna (punción seca) y escasa grasa sugieran fibrosis medular, así como las que tienen pocas fibras, pero se obtiene abundantes globos de grasa, son sugerentes de hipoplasia grasa medular. Estas observaciones deben ser corroboradas en forma microscópica y examinar varios frotis, donde a menor aumento (4 a 10x) se va a estimar la cantidad de células, morfología y maduración de megacariocitos, así como grupos celulares atípicos. Los depósitos de hierro también pueden ser evaluados en este aumento, pero en los gatos no son visibles como en los perros (Cowell y col., 2010).

La celularidad normal depende de la edad del animal, en animales jóvenes existe un 75 % de células y un 25 % de grasa, en animales adultos el 50 % es grasa y el otro 50 % son células y en animales gerontes el 75 % es grasa y el 25 % restante son células. Las médulas hipocelulares pueden ser el resultado de infecciones que generan supresión como el virus de leucemia felina, condiciones hipoplásicas como la insuficiencia renal, alteraciones tóxicas o idiopáticas. Las médulas hiper celulares pueden deberse a hiperplasia eritroide, mieloide, enfermedades mieloproliferativas o infiltración de células neoplásicas (linfoma o neoplasias metastásicas). Pueden presentarse además alteraciones displásica (alteración morfológica) y/o discrásicas (proporción anormal de una o más series celulares) indicativas de alteraciones patológicas (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la displasia de médula ósea. Tomado y modificado de Diagnóstico citológico y hematológico (Cowell y col., 2010).

Tipo celular	Características morfológicas
ERITROIDE	Citoplasma escaso, desigual. Sideroblastos anulares. Melocitosis/macrocitosis.
MIELOIDE	Binucleación y multinucleación, fragmentación nuclear. Hipersegmentación, hiposegmentación, núcleo en forma de rosquilla. Granulación citoplasmática anormal.
MEGACARIOCITOS	Formas enanas, multinucleación.
TODAS LAS LÍNEAS CELULARES	Vacuolización citoplasmática, maduración N:C asincrónica.

Los megacariocitos habitualmente se encuentran en los extremos de los frotis. Cada fibra contiene varios megacariocitos, menos de 3 a 5 por extendido sugiere una hipoplasia megacariocítica y más de 10 a 20 por campo sugiere hiperplasia. El 70 % o más de los megacariocitos son maduros, si esta proporción disminuye a menos de un 50% indica una respuesta regenerativa, cuando hay muchos megacariocitos inmaduros se sospecha de un defecto de maduración o una respuesta regenerativa temprana. La disminución de plaquetas en sangre periférica se puede deber a destrucción plaquetaria (trombocitopenia inmunomediada), utilización aumentada (CID), secuestro (generalmente en bazo) o supresión de la producción (toxicidad). En animales trombocitopénicos la hiperplasia megacariocítica indica destrucción o utilización plaquetaria, mientras que la hipoplasia megacariocítica indica supresión (Grindem, 2002).

La celularidad de la serie eritroide, hiperplasia o hipoplasia (se debe evaluar a 40x y 100x) requiere de tener en cuenta la celularidad total, también se debe de evaluar la morfología en busca de alteraciones displásicas como la presencia de megaloblastos (estas alteraciones incluyen, patrón de cromatina espeso, citoplasma aumentado, eritrocitos ortocromáticos macrocíticos y el contenido de hemoglobina aumentado en rubricitos), cariolisis, picnosis de células inmaduras y vacuolización de citoplasma y/o nuclear (Harvey, 2012). La alteración megaloblástica se ve con mayor frecuencia en gatos con ViLeF. La cariolisis, picnosis, vacuolización citoplasmática y nuclear se observan en necrosis medular causada por fármacos, radiación, etc. En las anemias no regenerativas, la médula ósea es hipocelular a normocelular con un incremento de la relación mieloide/eritroide (Grindem, 2009).

Para determinar si existe alteraciones en la serie mieloide, se debe evaluar el resto de las células medulares y sus proporciones. Las discrasias pueden deberse a neoplasias, respuestas regenerativas y/o detención de la maduración (con o sin neoplasia). La maduración de las células eritroides y mieloides normal se representa en una pirámide (Figura 10).

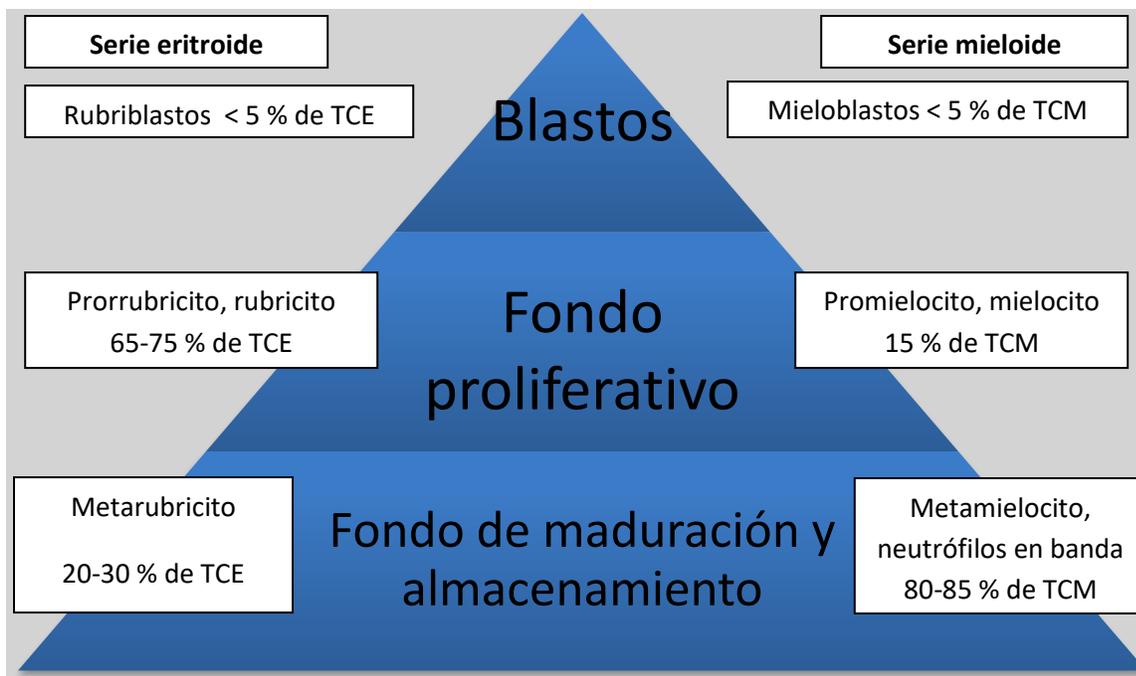


Figura 10. Maduración mieloide y eritroide normal. Tomado y modificado de Diagnóstico citológico y hematológico (Cowell y col, 2010).

La relación mieloide a eritroide (M:E) es la relación de las células mieloides con respecto a las células eritroides nucleadas. Las relaciones M:E cuantitativa se determina mediante una clasificación apropiada de 500 células nucleadas observadas en varias fibras medulares de varios campos (Harvey, 2012). En gatos y perros la relación normal habitualmente se sitúa entre 0.75:1 y 2:1, respectivamente. La eritrofagocitosis no se observa comúnmente en médula ósea de animales normales, cuando está presente se sospecha de una eritropoyesis ineficaz (destrucción de las células eritroides antes de abandonar la médula) y/o hemólisis extravascular. Generalmente menos del 2 % de las células medulares nucleadas son células plasmáticas. Cuando esta proporción aumenta a más de 3 %, se debe sospechar una estimulación inmune. Pueden evidenciarse células de Mott (células plasmáticas llenas de cuerpos de Russell) en procesos inflamatorios crónicos o mieloma múltiple. El mieloma múltiple, es una proliferación neoplásica de células plasmáticas, donde hay un marcado aumento de estas células y presencia de formas atípicas, es raro de ver en los felinos. Los mastocitos pueden aparecer en forma escasa, cuando son abundantes se debe de sospechar de una neoplasia de mastocitos. La diferenciación entre alteraciones neoplásicas y proliferativas mielodisplásicas de médula ósea, puede ser difícil. Las neoplasias primarias de médula ósea se pueden dividir en mieloproliferativas (mieloide, eritroide o megacariocítica) y linfoide, histiocítica e indiferenciada. Un aumento de 30 % o más de células blásticas, es indicador de leucemia, frente a un aumento del 30 % o más de linfoblasto y linfocitos, debemos de sospechar de linfoma, un 15 % o más de células plasmáticas, mieloma múltiple y grandes agregados de células atípicas es sugestivo de neoplasia metastásica, dependiendo de la celularidad observada (sarcoma histiocítico, carcinoma o sarcoma) aunque es poco frecuente en felinos (Grindem, 2009).

Por último, el examen de la médula ósea es útil para buscar organismos causantes de patologías como *Histoplasmosis spp*, *Mycoplasma spp*. y *Cytauxzoon felis*. En muchas ocasiones, las patologías de médula ósea dejan dudas desde el punto de vista diagnóstico y el análisis inmunofenotípico de las células hematopoyéticas mediante la citometría de flujo, ha representado una herramienta fundamental para clasificar distintas alteraciones de la médula ósea que cursan con sobreproducción de células (leucemias y linfomas) o con una producción deficiente de las mismas (anemias y síndromes mielodisplásicos) (Roa-Higuera y col, 2010).

4.8.2 Evaluación por citometría de flujo

La citometría de flujo es un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión (Orfao y col., 1995). La citometría de flujo se basa en el uso de moléculas fluorescentes, (generalmente se utilizan anticuerpos monoclonales) proporciona un análisis rápido de los tipos de células presentes en la médula ósea y porcentajes de los diferentes linajes celulares. Estos resultados se interpretan junto con el hemograma y la citología medular para determinar qué población se ve afectada. Además de estas evaluaciones se puede determinar el recuento total de células nucleadas y evaluar los recuentos absolutos de las diferentes poblaciones celulares. A diferencia de los porcentajes relativos de las diferentes poblaciones celulares, los recuentos absolutos proporcionan datos más objetivos para una evaluación precisa de la población celular afectada (Schalm's, 2010; Zini, 2017). Cabe señalar que una dificultad de esta técnica radica en la poca disponibilidad comercial de anticuerpos específicos de esta especie debiéndose complementar los ensayos con anticuerpos de humanos y de caninos, de los cuales se tiene muy poca información sobre la reactividad cruzada entre especies (Araghi y col., 2013).

5- CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, la anemia no regenerativa en felinos es de frecuente presentación (Winzelberg y Hohenhaus, 2019). El tratamiento y pronóstico dependerá de la causa subyacente, debiendo tener en cuenta que existen algunas patologías difíciles de diagnosticar. En este sentido, el estudio del hemograma, el recuento de reticulocitos, la bioquímica sérica y la serología son herramientas fundamentales para el diagnóstico de la patología causante de anemia. En felinos, los virus VIF y ViLeF son las causas más relevantes de anemia, sin embargo, se ha descrito la presencia de falsos negativos a pruebas serológicas y a la PCR, ya que estos retrovirus permanecen en fase de latencia no siendo siempre posible su detección (Galdo y col., 2016). Otras posibles causas de anemia no regenerativa son la aplasia de las células rojas, la anemia hemolítica no regenerativa crónica y las leucemias (Winzelberg y Hohenhaus, 2019). Para distinguir estos trastornos de la médula ósea, la evaluación citológica de la misma (mielograma) es imprescindible. El mielograma puede también orientar el pronóstico y la elección y/o monitoreo de un tratamiento específico. Sin embargo, una de las limitantes de esta técnica es que no permite la caracterización funcional de las células de la médula ósea. La citometría de flujo en cambio, permite la inmunofenotipificación mediante marcadores celulares, caracterizando las células sanguíneas y sus precursores; así como la expresión anómala de marcadores inmunofenotípicos (van de Loosdrecht, 2013; Zini, 2017).

En felinos, los estudios a nivel internacional que utilizan el mielograma para estudiar trastornos hematológicos son muy pocos (Turinelli y col., 2015, Byers, 2017) y en nuestro país inexistentes hasta el momento de realización de esta tesis. En este mismo sentido, son también muy escasos los reportes que utilicen la inmunofenotipificación por citometría de flujo en sangre periférica y médula ósea en felinos (Hoffmann-Fezer y col. 1996; Araghi y col. 2013) y no hemos encontrado reportes en Latinoamérica. Aún más, para felinos con anemias no regenerativas, hasta donde sabemos no existen estudios que caractericen la población celular en sangre periférica y médula ósea. Por lo tanto, este trabajo de tesis se propone utilizar la citometría de flujo como herramienta para aproximarnos al diagnóstico de este tipo de anemias, así como establecer si existen patrones diferenciales en los distintos marcadores celulares entre felinos con anemia no regenerativa y animales sanos.

6- HIPÓTESIS

Los gatos con anemia no regenerativa presentarán cambios hematológicos, bioquímicos y serológicos (VIF y/o ViLeF), así como una expresión diferencial de marcadores linfocitarios y eritrocitarios, en relación a los gatos clínicamente sanos.

7- OBJETIVOS

Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de las anemias no regenerativas en felinos, con énfasis en el uso de herramientas laboratoriales, mediante la evaluación de parámetros hematológicos, bioquímicos, serológicos y la caracterización de marcadores específicos de linaje celular.

Objetivos específicos

- Desarrollar la metodología de citometría de flujo en muestras de sangre periférica y médula ósea en felinos sanos y con sospecha clínica y laboratorial de anemia no regenerativa.
- Evaluar y clasificar la anemia no regenerativa a través del hemograma y el recuento de reticulocitos (relativo y absoluto) en felinos con sospecha clínica de anemia, en forma manual y automatizada.
- Caracterizar por citología e inmunofenotipicar por citometria de flujo los aspirados de médula ósea, en felinos clínicamente sanos.
- Evaluar la positividad a los virus VIF y/o ViLeF en el grupo de animales con anemia no regenerativa y comparar la relación CD4/CD8 en relación al grupo control (sanos).

8- MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar adelante esta tesis se debió desarrollar por primera vez en nuestro país el aspirado de médula ósea en felinos y la fenotipificación del tipo celular presente por citometría de flujo, así como el análisis de muestras de sangre periférica. El desarrollo metodológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Facultad de Veterinaria, UdelaR. Todos los procedimientos que involucraron animales contaron con el consentimiento de sus tutores y se realizaron bajo la supervisión de los médicos veterinarios responsables de este proyecto. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética (CEUA) de la Facultad de Veterinaria (Exp. Nro. 953).

8.1- PUESTA A PUNTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE FELINOS

Los análisis por citometría de flujo de muestras de sangre periférica y médula ósea de felinos se realizaron en el citómetro de flujo de la Facultad de Veterinaria, un Accuri C6 (BD Bioscience). Este equipo cuenta con 2 láseres, uno azul (20mW 488 nm argón-ion) y otro rojo (14.7mW 640 nm helio-neón). El equipo posee un detector FSC (*forward-scatter*/dispersión frontal que brinda información de tamaño celular), un detector SSC (*side-scatter*/dispersión lateral a 90° que informa de la complejidad o granulosidad celular) y 4 detectores de fluorescencia (FL1 533/30 nm, FL2 585/40 nm, FL3 >670 nm, FL4 675/25 nm).

8.1.1- Recuento de reticulocitos en sangre periférica

Para llevar a cabo la puesta a punto del recuento automatizado de reticulocitos por citometría de flujo se emplearon un total de 109 felinos (sanos=20, con anemias regenerativas n=6 y no regenerativas n=83). Se clasificó como anemia cuando se cumplieron al menos dos de estas condiciones: recuento total de eritrocitos <5.0 millones/ μ l, hematocrito (hto) <30% y/o hemoglobina (Hb) <8 gr/dl (Oregon State University-OSU, Miller y col.,2009, Tasca y col.,2009). La capacidad de regeneración medular se evaluó utilizando el valor absoluto de reticulocitos, considerándose como no regenerativos valores inferiores a 60000/ μ l (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2016 a).

Para proceder al recuento manual de reticulocitos, se utilizaron partes iguales de sangre (EDTA) y del colorante nuevo azul de metileno, manteniéndose la muestra durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un homogeneizado de la misma, se hizo el extendido y se contó a un aumento de 100 X, un total de 1000 células entre eritrocitos

maduros y reticulocitos. Se obtuvo el porcentaje relativo y el *valor absoluto de reticulocitos (millones/ μ L)* aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reticulocitos} \times \text{Recuento de eritrocitos (mill/ μ L)} \times 10.$$

Paralelamente, se puso a punto el conteo de reticulocitos en forma automatizada utilizando el colorante Orange Thiazole (Tho) en un citómetro de flujo (Accuri C6, BD BIOSCIENCES). El Tho es un colorante fluorescente que atraviesa la membrana celular y se une a los ácidos nucleicos, con afinidad por el ARN. Tiene un pico de excitación a 512 nm y un pico de emisión a 533 nm. Para realizar este procedimiento, se utilizó el protocolo proporcionado por el Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay, utilizado en ratones (Tho en una concentración stock de 1 μ g/mL). Se trabajó con diluciones de la muestra de sangre periférica en PBS-EDTA (PBS 1X, EDTA 2 mM). Se realizó una dilución inicial 1/10 (20 μ L en 180 μ L de PBS-EDTA), que se tomó de base para la segunda dilución 1/5 (30 μ L de la primera dilución en 1470 μ L de PBS-EDTA). A partir de la solución resultante trabajamos con 2 tubos. Uno de ellos compuesto por 200 μ L de la segunda dilución y 200 μ L de Tho y el segundo tubo se utilizó como control negativo sustituyendo el Tho por 200 μ L de PBS-EDTA. La incubación se realizó siguiendo las recomendaciones de Lee y col. (1986), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La adquisición de los datos se realizó en el citómetro de flujo Accuri C6. Se configuró la estrategia de *gate* (zonas lógicas de interés), basada en el tamaño y la granularidad de la población de interés en un gráfico de puntos (*dot plot*) empleando el detector de dispersión frontal en escala lineal (FSC) vs detector de dispersión lateral en escala logarítmica (SSC). Se estableció un umbral de residuos (*debris*) para eliminar los eventos que tienen propiedades de dispersión frontal y lateral bajas (*threshold* 80.000 en FSC-H). La adquisición de todas las muestras se realizó en modo *slow* para garantizar que las células pasen de a una frente al haz del láser y sean debidamente excitadas, adquiriendo como mínimo 50.000 células y se leyó en el detector FL1 (Figura 11).

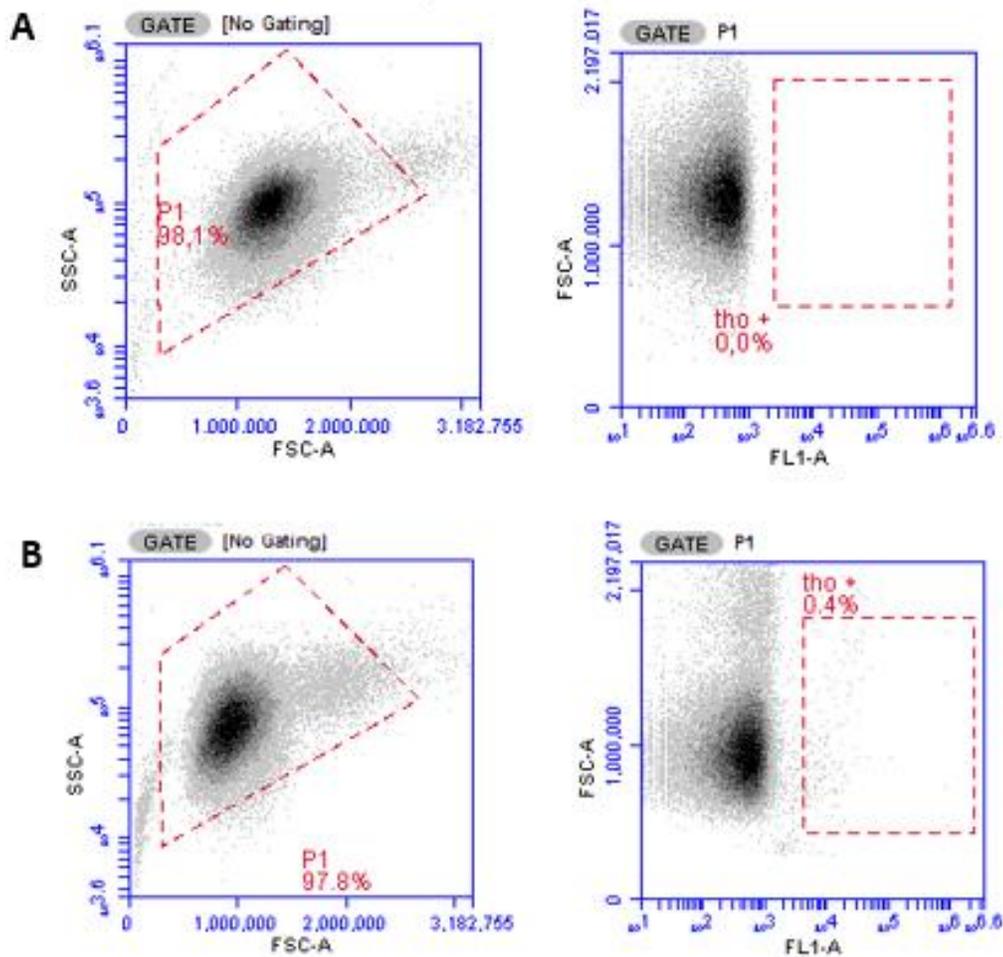


Figura 11. Representación gráfica de puntos (*dot plot*) de sangre periférica donde se muestran las regiones de interés. A la izquierda se observa el gráfico de FSC (escala lineal) vs SSC (escala logarítmica) donde P1 representa la población eritrocitaria, y se puede observar que se identifica correctamente una gran proporción del tipo celular (aproximadamente 98%). A la derecha se observa la intensidad de fluorescencia en FL1 (escala logarítmica) vs FSC (escala lineal) donde la región **tho+** representa la zona donde se ubican los reticulocitos al ser marcados con tho (fluorescencia específica). A. Control de sangre periférica sin marcar con tho donde se observa un 0% de marcación positiva. B Muestra de sangre periférica marcada con tho, procedente de un gato con anemia no regenerativa, con un 0.4% de marcación positiva.

8.1.2- Protocolo para serie roja: tinción con CD235a (glicoforina A)

El CD235a es un marcador que se expresa en células eritroides normales en prácticamente todas las etapas de diferenciación desde eritroblastos hasta eritrocitos maduros y es utilizado para la clasificación de eritroleucemias en diferentes especies incluido el felino (Erber y col., 1991).

La tinción de la línea roja se realizó de acuerdo a dos protocolos. Por un lado, se empleó el protocolo reportado por Araghi y col. (2013) similar a la tinción de la línea blanca, con la diferencia de que el buffer de lisis empleado fue Quicklysis o BD PharmLyse en lugar de DAKO, y que los lavados correspondientes se realizaron con PBS-SFB inactivado en lugar de PBS 1X (buffer fosfato salino 0,01 M, pH 7,2). Por otro lado, se realizó el procedimiento aplicado en humanos proporcionado por el Laboratorio de Citometría y Biología Molecular del Hospital de Clínicas, donde se realizó una dilución de la muestra, a partir de 30 μ L de sangre entera en 1000 μ L de PBS. A partir de esa dilución se tomaron 200 μ l y se adicionaron 4 μ L del anticuerpo anti-CD235a. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavó con PBS y centrifugó durante 5 minutos a 200 g (1500-2000 rpm). Se descartó el sobrenadante, se lavó nuevamente con PBS y se centrifugó a 200 g (1500-2000 rpm). El pellet fue suspendido con 1000 μ l de PBS y se realizó la adquisición en el citómetro de flujo. Para esta tinción, la gráfica FSC vs SSC se configuró en escala logarítmica.

8.1.3- Caracterización inmunofenotípica de la línea blanca

Para realizar la inmunofenotipificación de las muestras provenientes de sangre periférica y médula ósea de felinos se utilizaron anticuerpos anti-humanos previamente reportados en la bibliografía (Shirani, 2011; Araghi, 2013) y disponibles en el Laboratorio de Citometría y Biología Molecular del Hospital de Clínicas (Anexo II). Además, se ensayó la marcación con anticuerpos anti-canino con reactividad cruzada con felinos, disponibles en el Laboratorio de Análisis Clínicos de Facultad de Veterinaria (Anexo III) y anticuerpos específicos de especie referenciados en la bibliografía internacional. Las características de los anticuerpos con los que se trabajó en esta tesis se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Panel de anticuerpos y fluorocromos empleados en esta tesis.

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Especificidad	Especie	Clona	Fabricante
CD5	FITC	Linfocitos T	Felino	FE1.1B11	BIO-RAD
CD4	FITC	Linfocitos T Helper	Felino	vpg34	BIO-RAD
CD8 α/β	RPE	Linfocitos T Citotóxicos	Felino	vpg9	BIO-RAD
CD18	Alexa 647	Panleucocitario	Canino	CA1.4E9	BIO-RAD
CD21	Alexa 647	Linfocitos B	Canino	CA2.1D6	BIO-RAD
CD 235a	RPE	Eritroide	Humano	JC159	DAKO

Los anticuerpos conjugados con fluorocromos fueron seleccionados en base a su disponibilidad comercial, a su reactividad contra las células sanguíneas y hematopoyéticas felinas, al rango de espectro de luz en el cual se excita su marcador y por la capacidad del citómetro de registrar su emisión de fluorescencia. Para ello utilizamos el programa informático *Spectrum Viewer* de BD Biosciences (<http://www.bdbiosciences.com>). A partir de los anticuerpos disponibles, se diseñaron dos paneles para la línea blanca (Panel 1 y 2) detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Panel de anticuerpos, fluorocromos y canal de fluorescencia utilizados en esta tesis.

Panel	CD	Fluorocromo	Detector
Panel 1	CD4	FITC	FL1
	CD8 α/β	RPE	FL2
	CD18	Alexa 647	FL4
Panel 2	CD5	FITC	FL1
	CD21	Alexa 647	FL4

Se realizaron decenas de ensayos (datos no mostrados) para poner a punto las condiciones de trabajo. Utilizando muestras de sangre periférica y médula ósea, se probaron diferentes anticoagulantes: heparina en distintas concentraciones, citrato de sodio, anticoagulante citrato dextrosa y EDTA, distintas concentraciones de muestra (sin diluir, 1/2, 1/3, 1/4, 1/10 en PBS-BSA: PBS 1X 100 mL, 1 g BSA). Se probaron distintas

soluciones de lisis de glóbulos rojos (Quicklysis de Cytognos, VersaLyse de BeckmanCoulter, BD FacsLysing de BD Bioscience, BuikLysis de Cytognos, ExcellLyseEasy de Exbio, BD PharmLyse de BD Bioscience). Se estudió además el vorteo del homogeneizado periódico versus el homogeneizado constante mediante agitador y vórtex, y se determinó que esta última estrategia mejora la calidad celular. También se realizaron incubaciones variando temperaturas (4°C y temperatura ambiente) y tiempos (30 y 45 minutos).

El protocolo final se realizó en muestras de sangre periférica y médula ósea con EDTA conservadas a 4°C, no más de 24 horas para evitar la muerte celular. Previo a alicuotar la sangre, se procedió al homogeneizado en el agitador por 2 minutos. Fueron empleados 25 µl de sangre periférica y médula ósea en cada tubo y para evaluar la viabilidad celular se utilizó una tinción con Ioduro de propidio (20 µg/ml de Invitrogen de Termo Fisher Scientific), incluyendo en el estudio sólo muestras con una viabilidad superior al 85% (Anexo IV).

El procesamiento de tinción optimizado para los paneles 1 y 2 consistió en la incubación de los anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente, manteniendo los tubos en agitador. A continuación, se realizó la lisis de glóbulos rojos, empleando el kit BD PharmLyse, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó una relación 10:1 de buffer de lisis/muestra y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Una vez completada la lisis, se continuó con el procedimiento de lavado con la misma relación 10:1, empleando el buffer PBS-SFB inactivado (PBS 1X, 1% suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos, 0,1% de azida de sodio). Las muestras fueron agitadas en vórtex luego de la adición de los anticuerpos, cada vez que se realizaban lavados y antes de la adquisición. Cada muestra se analizó junto a un tubo sin marcación (control negativo) al que se le realizó el mismo procedimiento.

Para la adquisición de datos a partir de las muestras de sangre periférica y médula ósea, se creó una gráfica de puntos (*dot plot*) de FSC vs SSC y se estableció un umbral de residuos (*debris*) para eliminar los eventos que tienen propiedades de dispersión frontal y lateral bajas (umbral 800.000 en FSC-H). Además, se configuró un gráfico para eliminar dobletes (FSC-H vs FSC-A), de modo que sólo se tuvieron en cuenta los singuletes. La adquisición de todas las muestras se realizó en modo *slow* y se adquirió un mínimo de 5000 células. Cuando fue necesario, para identificar las diferentes subpoblaciones de leucocitos, se procedió a realizar una estrategia de *backgating*, un método que permite analizar *gates* en *dot plots* de interés, como ser Fluorescencia vs SSC y una vez identificada una región con características particulares, son retroactivadas en la gráfica FSC vs SSC para confirmar la población.

Para la titulación de anticuerpos se emplearon muestras de sangre periférica en volúmenes fijos (25 µl) y para la tinción se utilizaron 3 volúmenes de anticuerpos (2,5 µl,

2 μ l y 1,5 μ l), durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente para la lisis se empleó el kit PharmLyse, acorde a las recomendaciones del fabricante. Para seleccionar la concentración de anticuerpo más conveniente se determinó la tasa entre la MFI (media de intensidad de fluorescencia) de la población positiva y la MFI de la población negativa. El volumen final con el que se trabajó en esta tesis fue 2 μ l de anticuerpo por cada 25 μ l de sangre dado que los resultados fueron similares a los obtenidos con concentraciones mayores.

Para minimizar los problemas de solapamientos de longitudes de onda de emisión, utilizamos los 2 láseres disponibles en el equipo. Para contrarrestar el efecto de la superposición espectral de fluorocromos en los paneles de trabajo se realizó un proceso de compensación (Figura 12). Se trabajó con tubos con tinción simple, es decir marcados con un sólo anticuerpo y como control negativo de la técnica se utilizó para cada paciente un tubo sin marcación. Además, se realizaron los controles FMO (*fluorescence minus one*) para definir el punto de corte en la intensidad de fluorescencia de la población positiva y la negativa. Los controles FMO contienen todos los anticuerpos de la muestra menos 1, por lo tanto, en el detector en el cual no hay anticuerpo es en el que el FMO proporciona el control negativo. Se determinaron así los puntos de corte adecuados para cada una de las tinciones, los cuales fueron seteados para todas las determinaciones.

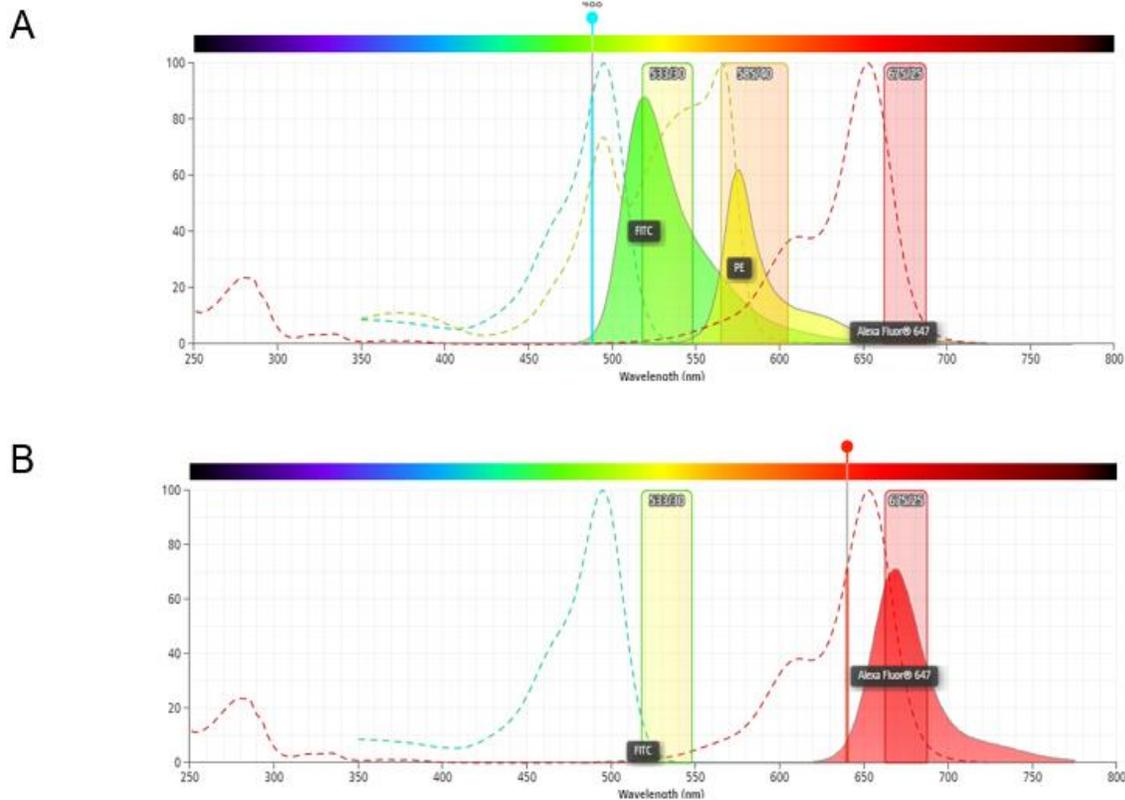


Figura 12. Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea continua) de los fluorocromos utilizados, FITC en verde, PE en amarillo, excitados con el láser azul (A) y Alexa Fluor 647 en rojo, excitado con el láser rojo (B). Se observan 3 detectores de fluorescencia (FL1 533/30 nm, FL2 585/40 nm, FL4 675/25 nm). Disponible en www.bdbiosciences.com.

En el panel 1, conformado por CD18 Alexa 647 (FL4), CD4 FITC (FL1) y CD8 α / β PE (FL2), los espectros de emisión de FITC y PE presentan solapamiento, por lo que se procedió a compensar la fluorescencia de cada uno de ellos. Para ello se realizó una tinción simple con CD4 FITC (FL1) y se generaron 2 poblaciones, una negativa y otra positiva, a partir de las cuales, se igualaron las medianas en el eje del detector a compensar, en este caso en FL2. Se corrigió a FL1 restando 4.3% en FL2. En el caso de la tinción simple con CD8-PE (FL2), se realizó el mismo procedimiento y se corrigió a FL2 restando 9.1% en FL1.

En el caso del panel 2, la porción final del espectro de emisión de CD21 PE teóricamente podría ser detectada por el filtro 675/25 (FL4) que registra la fluorescencia de Alexa 647 (CD18 A647), por lo que se evaluó si estos fluorocromos debían ser compensados o no.

Realizando la tinción simple con CD21 PE, se determinó que no afecta al detector FL4, por lo que no debió ser compensada la fluorescencia en ese canal.

8.1.4- Mielograma y caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo

Las muestras de médula ósea se obtuvieron de felinos sanos sometidos a castración (n=10) que fueron anestesiados con diazepam (0.2 mg/Kg) y ketamina (11 mg/Kg) vía intramuscular, teniendo en cuenta el estado de salud del animal, las contraindicaciones y previo consentimiento del tutor. La punción medular se realizó siguiendo la metodología descrita previamente por Byers (2017), previo rasurado y adecuada asépsia de la zona. Se puncionó el ala del ílion con el animal en decúbito lateral, utilizando una aguja intramedular Spinocan® de calibre 19 G y jeringa de 10 ml (Figura 13). Con la primera porción extraída se realizó el extendido utilizando dos portas objetos, se depositó el material sobre uno de ellos y con el otro en posición perpendicular (en cruz) se esparció el contenido. La segunda porción, se colocó en un tubo con EDTA y se transportó refrigerado al laboratorio donde fue analizado en el citómetro de flujo (BD, Accuri C6) en un máximo de 12 horas post extracción.

Con el material extendido en el portaobjeto se procedió a la tinción con May Grunwald-Giemsa e interpretación de mielograma al microscopio comenzando de menor a mayor aumento de acuerdo a la forma descrita por Grindem (2009). Primero se evaluó la calidad de la muestra en 10x: presencia de espículas para determinar si la celularidad era adecuada, estaba incrementada o disminuida. Se procedió a teñir el preparado y se buscaron las zonas más finas del extendido para determinar morfología y cantidad de las células. Las células más visibles a un aumento de 10X son los megacariocitos, donde se observó si son adecuados en número, morfología (normal, displásico, neoplásico), si la maduración era ordenada, desordenada, maduración a la izquierda o la derecha. Por último, se identificó la presencia de agregados celulares atípicos.



Figura 13. A la izquierda, se muestra el abordaje a la médula ósea en el ala de ílion y a la derecha, imagen macroscópica de material medular colectado, donde se visualizan espículas hematopoyéticas (flechas).

A mayor aumento (40x y 100x) se evaluó la morfología y maduración mieloide y eritroide, teniéndose en cuenta las mismas observaciones que para los megacariocitos. Se determinó la relación mieloide a eritroide, considerándose normal una relación que se aproxime a 1:1, aumentada $>3:1$ (hiperplasia mieloide y/o hipoplasia eritroide) y disminuida $<1:3$ (hipoplasia mieloide y/o hiperplasia eritroide). Se estimó el porcentaje de células blásticas (normal: $<2\%$ a 5% , incrementado: 5% a 20% hiperplasia o inicio de neoplasia, $>30\%$ leucemia), la presencia de linfoblastos y cuerpos linfoglandulares (linfoma). Se identificó la presencia de eritrofagocitosis (incrementada: hematopoyesis ineficaz, anemia hemolítica inmunomediada, parásitos hematológicos, postransfusión, neoplasia histiocítica). Se calculó el porcentaje de células plasmáticas (normal: $<2\%$, aumentado: $>3\%$ enfermedad inmunomediada, $>15\%$: mieloma múltiple) y el porcentaje de linfocitos pequeños (normal: $<10\%$, aumentada: folículo linfoide, hiperplasia linfoide, linfoma) (Cowell y col., 2010).

Además, se identificaron otros tipos celulares como mastocitos (normal $>2\%$, aumentados: mastocitosis sistémica, proceso reactivo, mielofibrosis, hipoplasia o aplasia medular), oseoblastos y osteoclastos (animal joven, remodelación ósea activa), fibroblastos (mielofibrosis, hipoplasia o aplasia medular, fibrosarcoma), células borrosas (frágiles: jóvenes, viejas, muriendo, neoplásicas o manejo traumático de la muestra). Por último, se evaluó la presencia de agentes patológicos (*Histoplasma spp*, *Mycobacterium*

spp, etc.) y de neoplasias (leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfocítica aguda o crónica, linfoma, sarcoma o neoplasia metastásica).

Para la inmunofenotipificación de muestras de médula ósea por citometría de flujo, se trabajó con un grupo de 5 felinos clínicamente sanos, de ambos sexos y entre 6 meses y 2 años de edad. Las muestras obtenidas se procesaron bajo el mismo protocolo que la utilizada en muestras de sangre periférica (ver sección 8.1.2 y 8.1.3)

8.2- DISEÑO EXPERIMENTAL

8.2.1- Animales y muestras

Se trabajó con un total de 32 felinos (de clínicas privadas y del hospital de Facultad de Veterinaria) de raza no definida de ambos sexos y diferentes edades comprendidas entre los 6 meses y 16 años. A todos los animales incluidos en el estudio se les realizó extracción de sangre periférica de la vena cefálica, con agujas 21G. Las muestras obtenidas se colocaron en tubos con EDTA para la realización del hemograma, recuento de reticulocitos e inmunofenotipificación y en tubos sin anticoagulante para la realización de la bioquímica sanguínea y la serología. En función de los resultados obtenidos se conformaron 2 grupos: Grupo I: Animales sanos (grupo control, n=15); Grupo II: Animales con anemia no regenerativa (n=17) (Figura 14). Se determinó la presencia de anemia y su clasificación de acuerdo a los intervalos de referencia mencionados anteriormente.

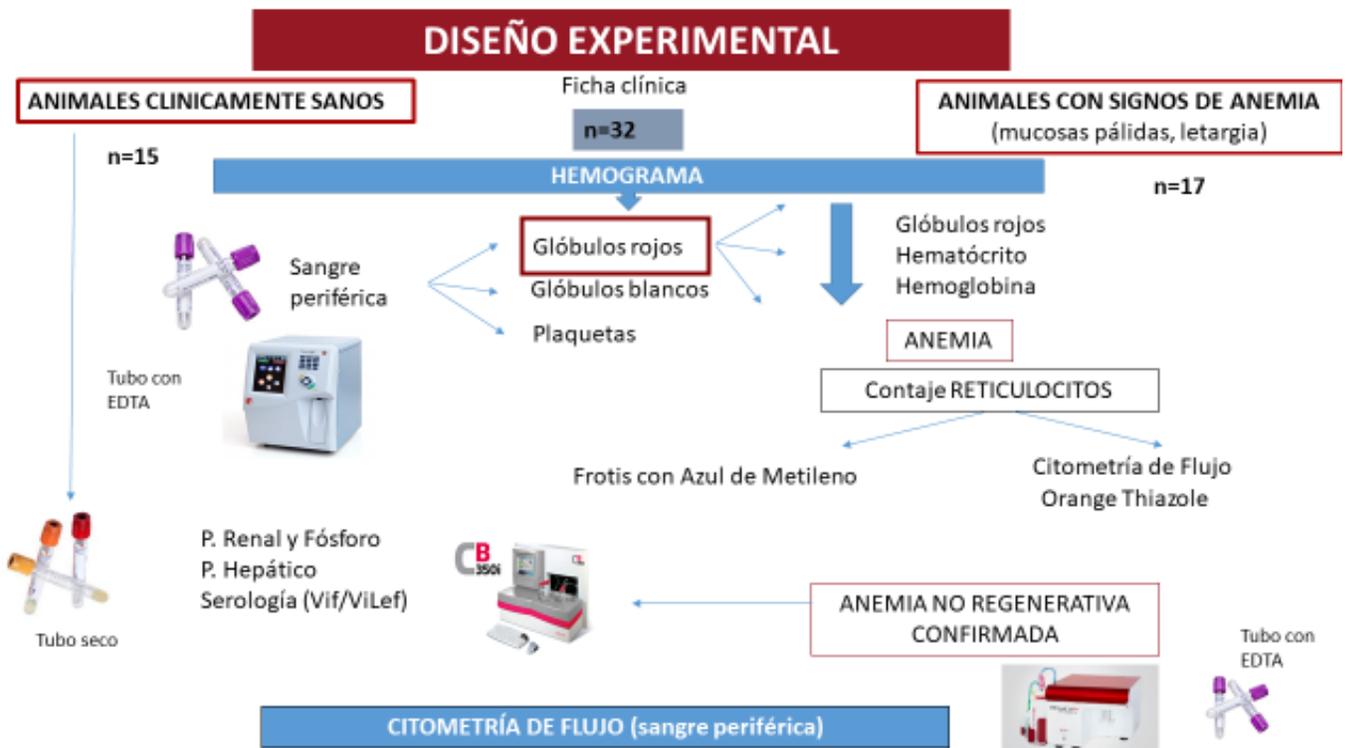


Figura 14. Esquema del diseño experimental en animales sanos y animales con anemia no regenerativa.

8.2.2- Hemograma

El hemograma se procesó en un contador hematológico veterinario (Orphée, Mythic 18 Vet, Ginebra, Suiza). Paralelamente se realizó un frotis sanguíneo y se coloreó con la tinción May Grunwald-Giemsa para valorar la morfología celular y verificar el recuento diferencial de los leucocitos.

8.2.3- Bioquímica sérica

El perfil renal (urea, creatinina y fosforo) y el perfil hepático (proteínas totales, albumina, globulinas, GOT, GPT Gamma GT, FAS, colesterol y bilirrubina) se determinaron a partir del suero de los pacientes anémicos y animales controles en un equipo semiautomático, CB 350i (Wiener lab Group, Rosario Argentina). Los rangos de referencia utilizados fueron proporcionados por laboratorios de diagnóstico veterinario (Oregon State University-OSU) y a partir de ellos se definieron anomalías y clasificaron los animales.

8.2.4- Serología para VIF y ViLeF

El test rápido de inmunocromatografía utilizado fue **FASTest® FIV** (MEGACOR Veterinary Diagnostics) para la detección cualitativa de anticuerpos en suero contra VIF y **FASTest® FeLV** (MEGACOR Veterinary Diagnostics) para la detección cualitativa de antígenos en suero de ViLeF (Westaman y col., 2019).

8.2.5- Citometría de flujo

Se aplicaron los protocolos optimizados en la Puesta a punto de citometría de flujo (Sección 8.1.2 y 8.1.3) para la inmunofenotipificaciones de subpoblaciones linfocitarias y eritrocitaria en los grupos sanos y anémicos no regenerativos.

8.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó un análisis univariado (Proc Univariate, Statistical Analysis system, SAS), en todas las variables para identificar los valores atípicos y verificar la normalidad de los residuales. Las variables reticulocitos, Tho, proteínas totales, GOT, Bb total, FAS, se ajustaron a una función logarítmica. Para el análisis de las variables hematológicas, de bioquímica sérica y de poblaciones linfocitarias se utilizó el procedimiento mixto (Proc Mixed, Statistical Analysis System, SAS), incluyendo en el modelo como efectos fijos el grupo (sanos vs anemia no regenerativa), el sexo y la edad como covariable. Se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar asociaciones entre variables.

Los datos se presentan como promedios \pm SEM. El nivel de significación fue $P < 0.05$ y los valores de P comprendidos entre 0.05 y 0.10 se consideraron como tendencia.

9- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 PUESTA A PUNTO DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE FELINOS

9.1.1- Recuento de reticulocitos en sangre periférica

Para el recuento de reticulocitos se emplearon 109 animales incluyendo gatos sanos (n=20) y gatos anémicos (anemia regenerativa n=6 y no regenerativa n=83). Se aplicaron dos metodologías: por un lado, el método manual, donde se evalúan los reticulocitos *agregatas*, y el método automatizado por citometría de flujo, que emplea el colorante orange thiazole, el cual no discrimina entre los dos tipos de reticulocitos, no obstante, debido a que el aporte de los *punctata* es despreciable, ambos métodos pueden ser comparados (Reagan y col., 1992; Valle y col., 2019). El aporte despreciable de los *punctatas* puede deberse a la baja cantidad de ARN remanente que presenta este tipo de reticulocito o a que los métodos automatizados no están optimizados para detectar tan bajas cantidades de ARN (Reagan y col., 1992; Valle y col., 2019). La correlación entre ambas metodologías se observa en la Figura 15.

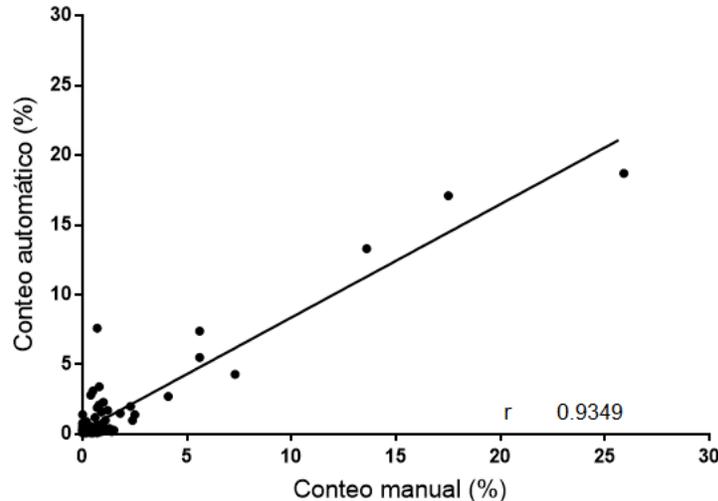


Figura 15. Gráfica de correlación de Pearson del recuento de porcentaje de reticulocitos de forma manual y automatizada de toda la población (no anémicos y anémicos) ($p < 0.0001$).

El análisis de correlación del recuento relativo (%) de reticulocitos de forma manual y automatizada (citometría de flujo) arrojó un valor de coeficiente de Pearson de 0.93. Este resultado demuestra que la cuantificación de reticulocitos en gatos utilizando Tho en

citometría de flujo, es un método reproducible que tiene una excelente correlación con la técnica manual; pero además es más preciso por la cantidad de células analizadas por muestra (comparado con el manual) y porque estima de forma objetiva ya que excluye los eritrocitos maduros que no se tiñen (por carecer de ARN).

En felinos, son escasos los reportes disponibles en la literatura siendo difícil contrastar nuestros resultados. Lee y col. (1986), utilizando similares condiciones en humanos (n=24), obtuvieron una excelente correlación ($r=0.97$) del porcentaje de reticulocitos determinado por el método manual y el método de Tho medido en los citómetros de flujo FACS IV, FACS 440 y FACStar (Becton Dickinson). Por su parte, Reagan y col. (1992) en un estudio en felinos con anemia inducida experimentalmente (n=5) y con patologías no especificadas (n=5), obtuvieron un coeficiente correlación de Pearson de 0.88 entre el método manual y el método automatizado en un citómetro de flujo EPICS C (Coulter Electronics). En felinos anémicos específicamente, en un estudio realizado por Valle y col. (2019) empleando 40 gatos, se obtuvo un valor de correlación de Pearson de 0.91 entre el método automatizado (contador hematológico ProCyte Dx, Idexx) y el método manual.

9.1.2- Protocolo para serie roja: Tinción con CD235a (Glicoforina A)

Las enfermedades mieloproliferativas son más prevalentes en felinos que en otras especies y en general se asocian a ViLeF (Shirani y col., 2011). Las células neoplásicas en la leucemia eritroide son primitivas y en muchas ocasiones se dificulta el reconocimiento como eritroides sin la ayuda de un análisis de inmunofenotipo (Hasserjian y col., 2011). El CD235a se expresa en células eritroides normales en prácticamente todas las etapas de diferenciación (eritroblastos a eritrocitos maduros) (Samsel y col., 2015), por lo que un anticuerpo que identifique esta molécula es una ayuda útil para la clasificación de las eritroleucemias. La expresión en las diferentes etapas de maduración de las células rojas, fue verificada usando sangre periférica humana (Anexo V).

En nuestro estudio se analizó la tinción con CD235a (CJ153 DAKO) en sangre periférica de 10 gatos, siendo 2 de ellos animales sanos y 8 anémicos (4 con eritroblastosis), empleando dos procedimientos. Por un lado, empleando sangre entera se realizó un protocolo de lisado de glóbulos rojos anucleados y no se encontró marcación positiva para CD235a. Alternativamente, con las mismas muestras se empleó otro procedimiento sin lisar los glóbulos rojos (protocolo cedido por la Unidad de Hematooncología del Hospital de Clínicas), el cual aumentó significativamente la proporción de células rojas analizadas, y se obtuvo una débil marcación positiva en 3 muestras (1 gato sano y 2 anémicos sin eritroblastosis evidente) (Figura 16 A y B). Sin embargo, en el resto de los felinos con un número de eritroblastos aumentado en sangre periférica, no se obtuvieron

resultados similares, por lo que no se pudo comprobar la utilidad de este anticuerpo para el diagnóstico de eritroleucemias por citometría de flujo en sangre periférica. En la literatura, se reporta un único caso de eritroleucemia en felinos, con una marcación positiva en sangre de 14% (Shirani y col., 2011). Por otra parte, en leucemias mieloides Araghi y col. (2013) observaron una débil marcación positiva en células de médula ósea en solo dos gatos. Cabe mencionar que, en el protocolo de lisis de glóbulos rojos anucleados, los remanentes nucleados, se encuentran muy próximos a las distintas poblaciones de células blancas, lo que puede ser un impedimento al momento de la discriminación celular. La principal limitación de este procedimiento fue no contar con otro marcador para determinar la población eritroide, como el CD71 (receptor de transferrina) empleado en medicina humana (Park y col., 2002). Además, el marcador panleucocitario utilizado en nuestro trabajo, como ya hemos mencionado, no es el más adecuado para discriminar la población linfoide, por lo que esta estrategia para discriminar las células no linfocitarias también presenta limitaciones.

La aleatoriedad de los resultados, junto a la débil marcación obtenida con el anticuerpo CD235a, así como los escasos reportes bibliográficos que respaldan la marcación positiva en felinos, nos permiten concluir que no es un anticuerpo de elección para el recuento de eritrocitos en sangre periférica en esta especie.

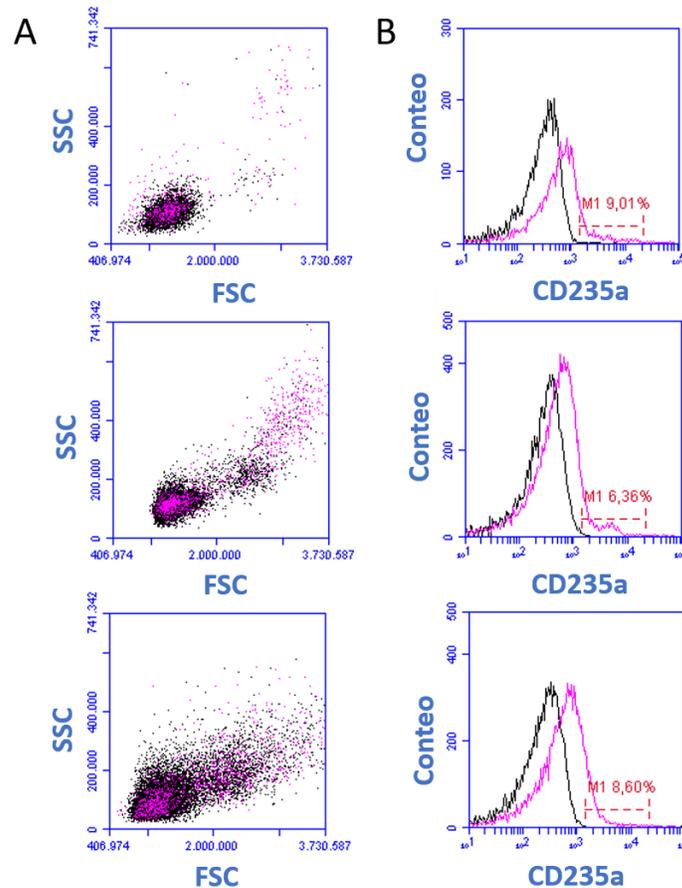


Figura 16. A. Representación gráfica de puntos de FSC vs SSC de las poblaciones celulares de la serie roja (sin lisar) de las 3 muestras de sangre periférica que fueron positivas a CD235a. B. Histogramas de la población celular completa (sin *gate*) marcadas con CD235a, donde se observan las poblaciones sin marcar (negro) y marcada (rosado) y el porcentaje de positividad de la población (M1).

9.1.3- Caracterización del patrón de expresión de CD18 en sangre felina

La molécula CD18 es una molécula de adhesión (integrina $\beta 2$) que se expresa en la superficie celular de todas las subclases de glóbulos blancos, con niveles variables de expresión según el estado de activación celular, aumentando su expresión en células activadas (Comazzi y col., 2006). Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de esta molécula en monocitos y células polimorfonucleares, respecto a los porcentajes de marcación encontrados en linfocitos, tal como había sido reportado previamente (Comazzi y col., 2006, Martini y col., 2020).

Al estudiar la expresión de CD18 en los linfocitos, observamos una intensidad de fluorescencia diferencial entre los distintos subtipos celulares, presentándose en algunos histogramas más de un pico de intensidad de fluorescencia (Figura 17, A). Para evaluar la subpoblación que componía cada pico se empleó un panel adicional (Panel 3: *CD18 Alexa Fluor 647*, *CD21 PE*, *CD5 FITC*) y se determinó que el pico de menor intensidad correspondía a los linfocitos B y el de mayor intensidad a linfocitos T (Figura 17, B). Esta diferencia de expresión que pudo comprobarse por primera vez en felinos, había sido previamente sugerida por Martini y col. (2020) quienes no pudieron confirmarlo debido a las combinaciones conflictivas de anticuerpos y fluorocromos utilizados en su trabajo. No obstante, existen reportes en caninos con resultados similares a los nuestros, donde se observa que las subpoblaciones de linfocitos B y T presentan intensidades de fluorescencia diferentes (Comazzi y col., 2006).

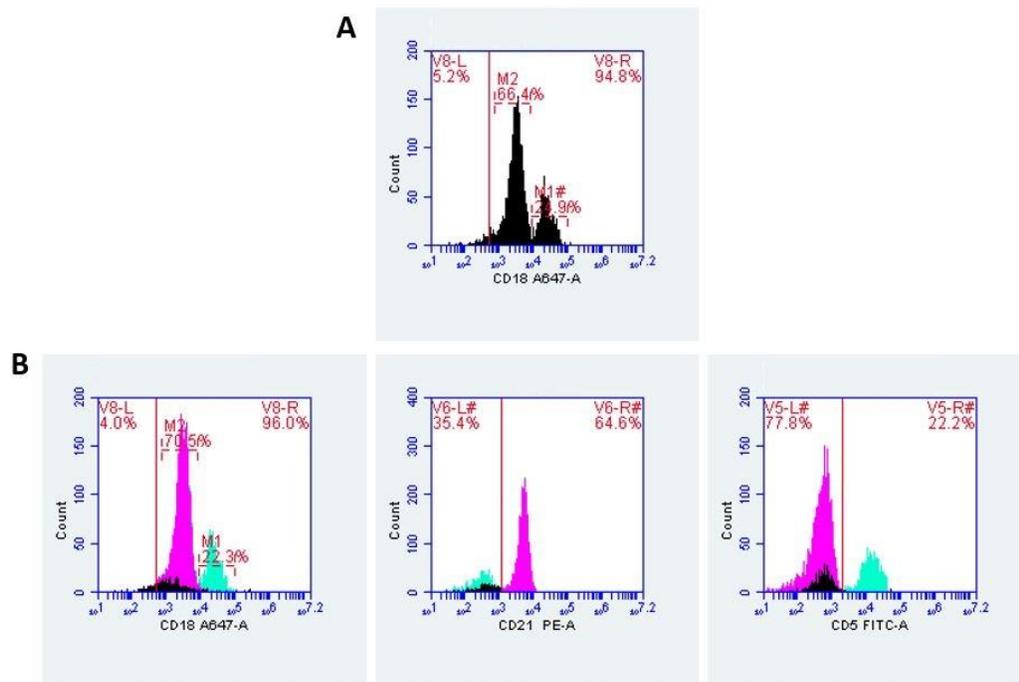


Figura 17. Citometría de flujo de sangre periférica de un felino. A. Histograma de CD18 proveniente del panel 1, donde se observan dos picos de intensidad de fluorescencia en la población positiva. B. Histogramas de CD18 (panleucocitario), CD21 (linfocitos B) y CD5 (linfocitos T) provenientes del panel 3, en donde se observan los linfocitos B marcados en rosado y los linfocitos T marcados en verde. En todos los casos se encuentra seleccionada específicamente la población linfocitaria.

En algunas muestras fue posible observar incluso tres picos de intensidad de fluorescencia para CD18, donde nuevamente el pico de menor intensidad correspondió a los linfocitos B y el segundo y el tercer pico coincidió con linfocitos T (Figura 18). En estos casos se evaluó si podía deberse a que la población T CD5 se dividía en las subpoblaciones T CD4 y T CD8, pero no se encontró una correspondencia consistente y exclusiva entre los picos observados y las subpoblaciones. De acuerdo a estos resultados podemos inferir simplemente que los linfocitos que expresan CD5 tienen distintas expresiones de CD18. Además, se pudo observar que la condición anémico o sano era independiente y no alteraba el tipo de expresión de 2 o 3 picos en el histograma, debido a que este hallazgo se presentó en ambos grupos. Hasta el momento no hemos encontrado trabajos que describan las subpoblaciones de linfocitos T en animales anémicos que permitan contrastar nuestros resultados.

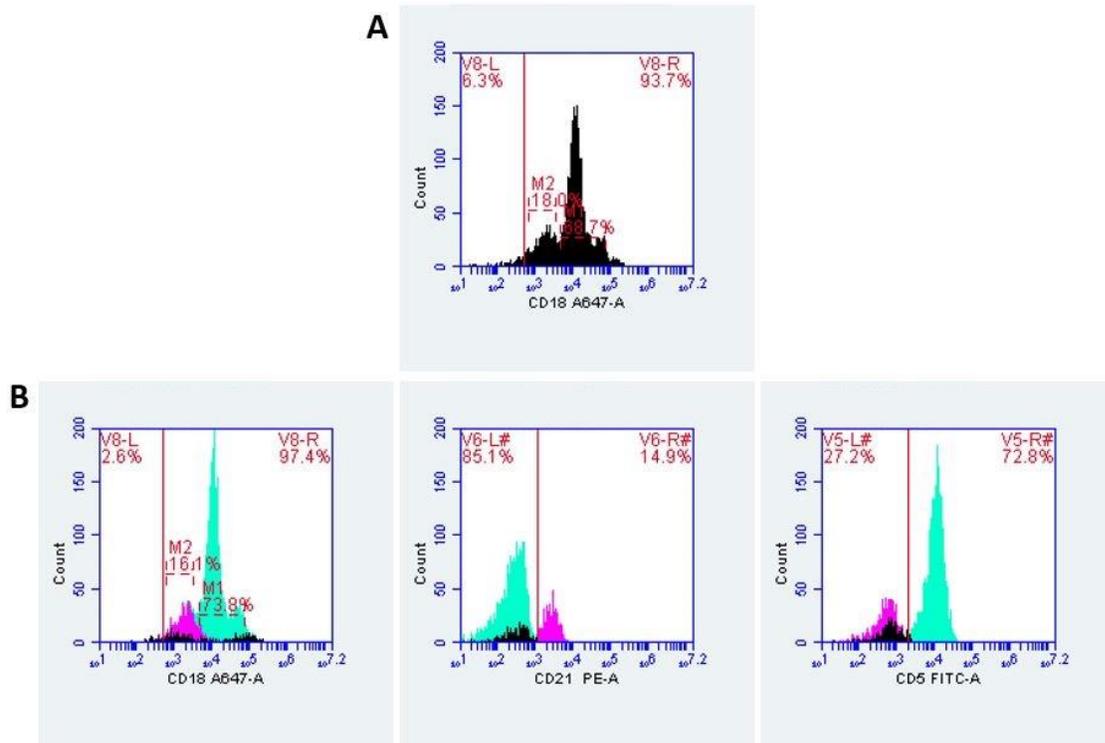


Figura 18. Citometría de flujo de sangre periférica de un felino. A. Histograma de CD18 proveniente del panel 1, donde se observan 3 picos de intensidad de fluorescencia. B. Histogramas de CD18 (panleucocitario), CD21 (linfocitos B) y CD5 (linfocitos T) provenientes del panel 3, en donde se observan los linfocitos B marcados en rosado y los linfocitos T marcados en verde. En todos los casos se encuentra seleccionada específicamente la población linfocitaria.

9.1.4- Mielograma y caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo

Mediante la extracción de médula ósea en felinos sanos bajo anestesia (n=5) se obtuvo material para realizar extendidos y poder estudiar el mielograma, donde la celularidad, morfología y relación M:E se correspondieron con un mielograma normal acorde a lo reportado por la bibliografía (Figura 19) (Grindem, 2002; Cowell, 2009). Por su parte, la inmunofenotipificación de la médula ósea en felinos presentó varias limitantes debido a la escasez de muestras y a la falta de consentimiento de los propietarios para realizar el procedimiento (anestesia general y extracción de la muestra). La conservación y viabilidad celular representó el mayor inconveniente debido a la alta mortalidad de las mismas en médulas frescas y congeladas. Además, la escasa información bibliográfica y descriptiva existente en esta especie no nos permitió mejorar la estrategia experimental (Shirani 2011, Araghi 2013), obteniendo resultados de marcación similar a los de este trabajo. Cabe señalar que viabilidad y morfología celular, no son comparables debido a que los resultados no son presentados en dichos trabajos. Por otra parte, en caninos, la evaluación de la médula ósea por citometría de flujo, se utiliza de rutina con fines de fenotipificar leucemias y detectar infiltrados linfocitarios en linfomas multicéntricos (Rout y Avery, 2017; Comazzi y col., 2011; Sánchez y col., 2022). Se plantea a futuro continuar este desarrollo metodológico y alcanzar mejores resultados.

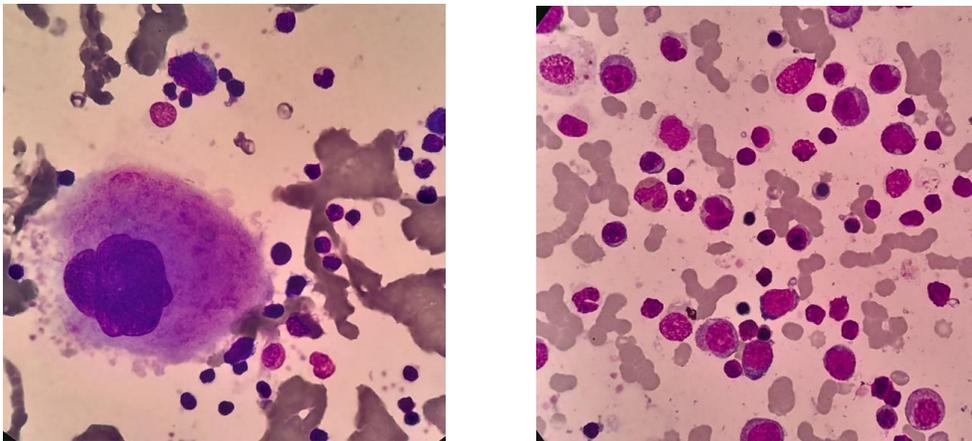


Figura 19. Imágenes microscópicas (100 X) obtenidas de punción de médula ósea de un felino sano. A la izquierda se observa un megacariocito. A la derecha se pueden apreciar distintas poblaciones del linaje eritroide y mieloide con diferentes niveles de maduración.

9.2- DISEÑO EXPERIMENTAL

9.2.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS

Fueron considerados en este trabajo 32 felinos (sanos, n=15 y anémicos, n=17). La edad promedio del grupo control (animales sanos) fue de 5,1 años (rango 8 meses-12 años) y en el grupo de felinos anémicos fue de 6,6 años (rango 1-14 años). No existieron diferencias en la edad entre los grupos (sano: 5.1 ± 1.0 y anémico: 6.6 ± 0.9). El grupo control estuvo constituido por 8 machos y 7 hembras, y el grupo de anémicos por 10 machos y 7 hembras. Respecto a la raza, a excepción de un gato (Siamés) del grupo de sanos, el resto no presentó raza definida.

9.2.2- HEMATOLOGÍA

Línea roja

Los valores de los parámetros hematológicos de la serie roja del grupo control (sanos) se ubicaron todos dentro del rango de referencia para la especie felina utilizados por el laboratorio de la Facultad de Veterinaria.

En el grupo de animales anémicos, los valores de eritrocitos, Hb y Hto, fueron menores que en el grupo control ($p < 0.0001$) respondiendo a lo seleccionado según nuestro criterio de inclusión. En ambos grupos, los valores de VCM y CHCM estuvieron dentro de los rangos de referencia, siendo esto lo esperable para las anemias no regenerativas, si bien hay situaciones donde se puede observar macro o microcitocis (Villers, 2009). Al comparar entre grupos, el CHCM fue menor en felinos anémicos ($p < 0.0001$), mientras que el VCM tendió a ser mayor que en el grupo control ($p = 0.08$) (Tabla 4). El CHCM se ve disminuido en deficiencias de hierro y cobre, las cuales no fueron estudiadas en este trabajo y que podrían explicar estos valores en animales anémicos. Por su parte, la tendencia al aumento del VCM puede indicar que el gato estuvo regenerando o compensando una anemia en los últimos 21 días, pero también podría indicar la presencia de otros procesos patológicos que causan macrocitosis, como, por ejemplo, el síndrome mielodisplásico secundario a la infección por ViLeF (Sykes y col., 2014; Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 b). Al evaluar los resultados individualmente observamos que los gatos anémicos que presentaron macrocitosis, fueron positivos a ViLeF, siendo este hallazgo consistente con lo ya mencionado. Las posibles causas de anemia en nuestros pacientes se investigaron y se describen en el Anexo VI.

Tabla 4. Parámetros hematológicos de la línea roja de felinos sanos vs anémicos.

	Valor Referencia	Sanos	Anémicos	p valor
Eritrocitos (x10 ⁶ /uL)	5-10 *	9.01 ± 0.3	3.93 ± 0.3	< 0.0001
Hemoglobina (g/dL)	8-15 *	12.9 ± 0.5	5.5 ± 0.4	< 0.0001
Hematocrito (%)	30-45 *	35.9 ± 1.2	16.9 ± 1.2	< 0.0001
VCM (fL)	39-55 *	40.5 ± 1.9	45.3 ± 1.8	0.08
CHCM (g/dL)	30-36 *	35.9 ± 0.5	31.9 ± 0.5	< 0.0001
Reticulocitos absolutos manuales	(<60000/uL) **	25901 ± 5405	16900 ± 4604	0.03

*Oregon State University

** Cornell University

En relación al conteo absoluto de reticulocitos, observamos diferencias significativas entre grupos, siendo menor en el grupo de animales con anemia respecto a los sanos ($p=0.03$), (Tabla 4). En anemias no regenerativas es esperable encontrar bajos recuentos de reticulocitos, ya que la médula ósea disminuye la producción de células eritroides debido a diferentes mecanismos fisiopatológicos, principalmente una inefectiva eritropoyesis o una disminución en el tiempo de vida de los eritrocitos (Winzelberg y col., 2019).

Línea blanca

Los parámetros hematológicos para la serie blanca del grupo control se ubicaron dentro del rango de referencia de especie utilizado por el laboratorio (Oregon State University), a excepción del recuento de eosinófilos, que en ambos grupos (anémicos y sanos) estuvo ligeramente por encima del límite superior. Sin embargo, esta diferencia podría no ser evidente si nuestros resultados se comparan con otros rangos de referencia bibliográficos, donde el límite superior alcanza los 1800/uL, (Granat y col., 2014; Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 c). Cabe mencionar que, en nuestro país, hasta el momento, no se han determinado los valores de referencia hematológicos para la especie felina.

El número absoluto de leucocitos, monocitos y eosinófilos entre el grupo control y los animales anémicos fueron similares (Tabla 5). Sin embargo, el número de linfocitos fue significativamente menor en el grupo anémico respecto a los sanos ($p=0.01$), manteniéndose en ambos casos dentro del rango de referencia utilizado. Asimismo, se observaron linfopenias en 6 de 8 animales anémicos con serología positiva para VIF y/o ViLeF. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Costa y col. (2017) que

también observaron linfopenia en gatos positivos a ViLeF, aunque solo en el 39% de los casos. La infección por ViLeF produce cambios hematológicos como linfopenia y neutropenia, atrofia tímica y agotamiento de las zonas paracorticales de los nódulos linfáticos, deterioro de la función de las células T y, en menor medida, de las células B, asociadas a inmunosupresión (Hartmann y col., 2006; Lutz y col., 2009; Hartmann y col., 2011; Sykes y col., 2014). Cabe destacar que en nuestro estudio el primer criterio de inclusión de los animales enfermos era la presencia de anemia no regenerativa y no la positividad a ViLeF.

Por su parte, el recuento absoluto de neutrófilos tendió a ser mayor en los animales anémicos ($p=0.09$), donde en 6 de 17 animales de este grupo, se evidenció un leucograma inflamatorio caracterizado por neutrofilia (Rebar, 2003). Contrariamente, 3 gatos presentaron neutropenia, 2 de ellos positivos a ViLeF, estando asociada esta infección viral a una supresión de la actividad medular que fue previamente reportada (Gleich y col. 2009; Hartmann, 2011 y Costa, 2017).

Tabla 5. Parámetros de hematología de línea blanca de felinos sanos vs. anémicos.

	Valor de referencia	Sanos	Anémicos	p valor
Leucocitos (/uL)	5500-19500	14450 ± 3370	22476 ± 6373	0.15
Neutrófilos absolutos (/uL)	2500-12500	8795 ± 2797	16846 ± 4745	0.09
Linfocitos absolutos (/uL)	1500-7000	3589 ± 343	2036 ± 353	0.01
Monocitos absolutos (/uL)	0-850	375 ± 107	261 ± 101	0.45
Eosinófilos absolutos (/uL)	0-750	982 ± 257	941 ± 529	0.92

9.2.3- BIOQUÍMICA

Perfil renal

Los valores de los parámetros del perfil renal del grupo control se ubicaron dentro del rango de referencia de especie utilizados por el laboratorio. La urea se vio significativamente afectada por la condición de salud del animal, siendo mayor en felinos anémicos ($p=0.05$). Por otro lado, tanto la creatinina, como el fósforo no presentaron variaciones entre animales sanos vs anémicos (Tabla 6). En el análisis individual de los gatos del grupo anémico, 3 de 17 felinos presentaron falla renal (18%) con urea, creatinina y fósforo muy por encima del rango de referencia lo que podría explicar los resultados encontrados. En la literatura hemos encontrado que, en felinos con enfermedad renal crónica, la anemia se presentó en un 23% de los animales incluidos en dicho estudio (Javard y col., 2017). Por su parte, Betting y col. (2022) reportaron que,

en 64 felinos con enfermedad renal crónica, el 17% presentó anemia, siendo estos resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Como ya se mencionó, en la enfermedad

renal crónica la eritropoyetina disminuye, siendo la principal causa de anemia, sumado a que la uremia causa disminución del tiempo de supervivencia de los eritrocitos y tiene efectos supresores sobre la médula ósea (Chalhoub y col., 2011). Asimismo, las hemorragias clínicas o subclínicas por úlceras en el aparato digestivo y la elevación de la hormona paratiroidea, también contribuyen al desarrollo de anemia por disminución de la eritropoyesis (White y Reine, 2009; Chalhoub y col., 2011; Couto y Nelson, 2014). Finalmente, 4 de los 17 animales presentaron sólo aumentada la urea, pudiendo deberse esto, a causas extrarrenales (deshidratación, catabolismo proteico, hipotermia, disuria, poliuria), (Ambrosio y col., 2020).

Tabla 6. Parámetros del perfil renal de felinos no anémicos vs. anémicos.

	Valor de referencia	Sanos	Anémicos	p valor
Urea (mg/dL)	21.42-74.99	46.3 ± 42.9	166 ± 40.6	0.05
Creatinina (mg/dL)	1.0-2.0	1.1 ± 0.4	1.9 ± 0.4	0.15
Fósforo (mg/dL)	3.5-6.1	4.8 ± 1.1	7.1 ± 1.0	0.13

Perfil hepático

Los valores de los parámetros del perfil hepático en el grupo control se ubicaron dentro del rango de referencia de especie utilizados por el laboratorio, a excepción de la FAS cuyos valores fueron mayores a dicho rango (Tabla 7). Esta variación podría explicarse por la inespecificidad de esta enzima ya que es producida por varios tejidos del organismo. En este sentido, la elevación de la FAS podría deberse a que 4 de los 15 felinos eran menores de un año y se ha reportado que en animales jóvenes en período de crecimiento puede verse aumentada de 2 a 10 veces con respecto a felinos adultos (Wittwer, 2021; Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 d). Los aumentos en la actividad de FAS en gatos, ocurren en enfermedades hepatobiliares y tumores hepáticos (por ejemplo, linfoma), pero el aumento es menos confiable y de menor magnitud en comparación con situaciones análogas en perros (Center y col., 1986; Center y col., 1992). En animales anémicos, la GGT tendió a ser mayor y las FAS fue menor respecto al grupo sano ($p=0.09$ y $P=0.01$, respectivamente), estando ambas variables dentro del rango de referencia (Tabla 7). En el gato, los aumentos de GGT pueden preceder a los aumentos de FAS y se considera un indicador más sensible de enfermedad hepática en esta especie, siendo una excepción la lipidosis hepática donde la FAS aumenta primero (Center y col., 1986). En los felinos la FAS se caracteriza por una vida media corta (6 horas) y por su baja concentración en el citoplasma de los hepatocitos, siendo un parámetro de importancia clínica en esta especie (Cornell

University College of Veterinary Medicine, 2023 d). En un estudio de 69 gatos con y sin evidencia histológica de enfermedad hepática, las actividades de GGT más altas se observaron en gatos con obstrucción del conducto biliar extrahepático, colangiohepatitis-colangitis y cirrosis (Center y col., 1986). Cabe señalar que estas patologías en los felinos incluidos en nuestro estudio, fueron desestimadas debido a los valores obtenidos en el enzimograma hepático.

Al comparar los grupos de trabajo, la albúmina fue significativamente menor ($p < 0.0001$) en animales anémicos en comparación a los animales sanos (Tabla 7). Las menores concentraciones de albúmina pueden deberse a una disminución en la ingesta, a procesos inflamatorios, insuficiencia hepática y a enfermedades perdedoras de proteínas (enteropatías y glomerulopatías), (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 e). En este sentido, como ya se mencionó, varios animales en nuestro estudio (6/17), presentaron evidencias de inflamación en el hemograma. Está reportado que en perros con procesos inflamatorios, las concentraciones de albúminas fueron significativamente más bajas respecto a animales sanos, siendo ésta considerada como una protetina de fase aguda negativa (Torrente y col., 2015). En este sentido, en nuestro estudio, 3 de 17 felinos presentaron enfermedad renal crónica y 2 de 17 hepatopatías, siendo consistente con lo reportado en la bibliografía (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023 e).

Por su parte, los valores de la bilirrubina total fueron mayores en el grupo de felinos anémicos en comparación con los animales sanos ($p=0.03$) (Tabla 7). Dentro del grupo anémico, 5 gatos presentaron valores por encima del rango de referencia (4 de ellos además con aumento de la Bb directa, GOT, GPT y/o FAS). El aumento de la bilirrubina puede estar asociado con patologías hepáticas, siendo en las anemias no regenerativas, la lipidosis hepática una de las más frecuentes en felinos (Armstrong y col., 2009; Kuzi y col., 2017). Por lo tanto, los aumentos en las actividades de GPT, GOT y FAS con hiperbilirrubinemia a menudo son indicativos (pero no 100% específicos) de lipidosis (Cornell University College of Veterinary Medicine, 2023) pudiendo ser la explicación de los resultados hallados en estos 4 pacientes.

Tabla 7. Parámetros del perfil hepático de felinos sanos vs anémicos.

	Valor de referencia	Sanos	Anémicos	p valor
Proteínas totales (g/dL)	6.0-8.1	7.6 ± 0.4	7.1 ± 0.4	0.15
Albúmina (g/dL)	2.6-4.0	3.4 ± 0.1	2.7 ± 0.1	< 0.0001
Globulinas (g/dL)		4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.4	0.85
GPT (UI/L)	5-65	53.8 ± 39.4	122.8 ± 37.3	0.22
GOT (UI/L)	17-48	14.5 ± 2.5	84.0 ± 37.9	0.14
GGT (UI/L)	1-8	1.2 ± 0.3	1.9 ± 0.2	0.09
FAS (UI/L)	10-70	102.4 ± 19.3	46.3 ± 18.3	0.01
Colesterol (mg/dL)	101-323	134.2 ± 18.3	142.4 ± 17.3	0.75
Bilirrubina total (mg/dL)	0-0.5	0.16 ± 0.02	0.93 ± 0.36	0.03

9.2.4- CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE SANGRE PERIFÉRICA

Línea blanca

Distinguir las distintas subpoblaciones de células leucocitarias en felinos representó un desafío debido a la agregación plaquetaria y restos celulares que se producen en la sangre de esta especie (Comunicación personal con Valeria Martini –Italia-, 2022 y Sara Moreno –España-, 2022). En este sentido, la optimización del proceso de homogenización de la sangre felina para evitar aglutinación y por ende la ausencia de marcación específica, fue fundamental para caracterizar fenotípicamente este tipo de muestra.

Panel 1 (CD18, CD4, CD8) y Panel 2 (CD21, CD5)

La marcación específica de las moléculas con los diferentes anticuerpos permitió la cuantificación de los linfocitos y sus diferentes subclases (Tabla 8). Para cada uno de los anticuerpos se determinó el porcentaje de marcación mínimo y máximo obtenidos. Los resultados para los gatos sanos expresados en porcentaje fueron los siguientes: CD18 (55.6-96.7), CD21 (13.3-69.5), CD5 (22.1-67.2), CD4 (11.7-47.6), CD8 (6.6-27.7). En los gatos anémicos el porcentaje del valor mínimo y máximo de cada anticuerpo se detallan a continuación: CD18 (35.5-99.5) CD21 (2.1-49.8), CD5 (13.1-90.3), CD4 (4.8-38.9) y CD8 (5.3-79.6).

Al analizar la suma de CD5+ (linfocitos T) y CD21+ (linfocitos B), para todos los casos se observa que el valor obtenido se encuentra cercano a los valores de CD18 encontrados. Sin embargo, la suma de CD4+, CD8+ y CD21+ es sensiblemente menor, en concordancia con lo reportado para gatos sanos, donde se ha observado que una mediana de 22.6% de linfocitos no expresan CD4 ni CD8 (CD4-/CD8-) (Rout y col., 2020). Todos los resultados obtenidos se expresan en los Anexos VII y VIII.

Tabla 8. Subpoblaciones linfocitarias (%) de felinos sanos vs anémicos.

	Sanos	Anémicos	p valor
CD18 (panleucocitario)	86.4 ± 3.9	76.9 ± 3.8	0.09
CD21 (Linfocitos B)	28.8 ± 3.3	21.0 ± 3.1	0.09
CD5 (Linfocitos T)	47.5 ± 4.0	52.3 ± 3.8	0.39
CD4 (Linfocitos T colaboradores)	24.4 ± 2.6	18.0 ± 2.5	0.09
CD8 (Linfocitos T citotóxicos)	17.9 ± 3.5	23.6 ± 3.3	0.24

No hemos encontrado reportes de niveles de expresión de CD18 en sangre periférica de gatos normales, sin embargo, trabajando con muestras de nódulos linfáticos de gatos normales (n=11), Rütgen y col. (2022) reportaron valores similares a los encontrados en nuestro trabajo en sangre periférica (86.93% ± 11.01 vs 86.4 ± 3.9 %, respectivamente). Respecto a CD21 las medias reportadas por Vapniarsky y col. (2020) en sangre periférica de animales sanos (n=8) utilizando la misma clona, fueron levemente superiores (38.7%) a los de nuestro trabajo, por su parte, Rout y col. (2020) cuantificaron los linfocitos B en valores absolutos (1700/uL), no siendo éste último un dato comparable. Sin embargo, Knotek y col. (2000), empleando otras clonas para este mismo anticuerpo en gatos sanos (n=36), reportó un porcentaje similar al nuestro (19.4% ± 9.9%). Además, estos autores, reportaron un valor de CD5 de 65.5% ± 14.4%, también concordante con los datos obtenidos en nuestro trabajo (Tabla 9). Finalmente, empleando las mismas clonas, Campbell y col. (2004) reportaron una media de CD4 de 29.94% y de CD8 de 19% (n=50), datos que concuerdan con los nuestros resultados (Tabla 8).

El porcentaje de CD18, CD21 y CD4 tendió a ser menor en los felinos anémicos en comparación a los animales sanos (p=0.09). En el caso particular de CD4, esto podría deberse a que, dentro del grupo anémico, en nuestro estudio, 8 de los 17 felinos fueron positivos a VIF y/o ViLeF. Esto es consistente con lo reportado a nivel internacional donde se vio que estos virus provocan disminución de este tipo de linfocitos (Colado y Pérez, 2010). Por su parte, no hay datos en la bibliografía que expliquen la tendencia a la baja de CD18 y CD21 en animales anémicos, pero sí hay un trabajo que muestra una disminución significativa de CD21 en animales positivos a VIF monitoreados hasta su deceso (p = 0.0061) (Beczowski y col. 2015), en nuestro estudio el subgrupo de animales anémicos con serología positiva podrían ser los responsables de la disminución de CD21.

9.3- RELACIÓN CD4/CD8 EN ANIMALES ANÉMICOS POSITIVOS A VIF Y VILEF

El diagnóstico serológico para detección de los virus VIF y/o ViLeF en el grupo de animales anémicos, permitió determinar un porcentaje de 47% de positividad a los mismos (8/17). Específicamente, la positividad serológica a VIF fue de 6%, a ViLeF fue de 17.5%, siendo positivos a ambos virus el 23.5%. En el subgrupo de felinos anémicos positivos a VIF y/o ViLeF, fue posible evaluar el cociente CD4/CD8, el cual se estudia como marcador pronóstico a estos virus (Hofmann-Lehmann y col., 1997). La infección por VIF y ViLeF se asocia, como ya se mencionó, con una disminución de las células T CD4 de la sangre periférica y una activación de los linfocitos T citotóxicos CD8. Esto trae como consecuencia una disminución de la relación CD4/CD8 en gatos infectados en comparación a la observada en gatos no infectados (Hofmann-Lehmann y col., 1997; Colado y Pérez, 2010). De todos modos, en una investigación realizada en gatos positivos a VIF, la clasificación de los gatos en los grupos “saludables” y “no saludables”, basados en el examen físico del animal (puntuación gingival y peso corporal, independientemente del serodiagnóstico de VIF), no arrojó diferencias estadísticamente significativas en la proporción CD4/CD8 entre grupos. Esto estaría indicando que la alteración de este cociente no fue confiable para distinguir gatos positivos para VIF (que se esperaba coincidieran en el grupo “no saludables”) (Beczowski y col., 2015).

En nuestro trabajo, empleando los datos de CD4 y CD8 obtenidos, se analizó la relación CD4/CD8, presentando los gatos sanos un rango de valores de 0.8 a 3.3 con una mediana de 1.6 ± 0.2 , y los gatos anémicos positivos a al menos uno de los virus, un rango de 0.3 a 2.1 con una mediana estadísticamente menor, de 0.9 ± 0.2 ($p=0.02$) (Figura 20 A). En los gatos sanos, el valor de este cociente presentó un comportamiento similar a lo reportado a nivel internacional (Novotney y col., 1990; Hoffmann y col., 1992; Knotek y col., 2000; Campbell y col., 2004; Beczowski y col., 2015). Por su parte, Hoffmann-Fezer y col., (1992) estudiaron particularmente los subconjuntos de células T en gatos positivos a VIF, encontrando que la relación CD4/CD8 se redujo a un valor de 1.5 en comparación con el valor de 3.3 de los gatos control seronegativos para VIF ($p<0.001$). De forma similar, Beczowski y col. (2015), también trabajando con gatos positivos a VIF, encontraron diferencias significativas del cociente CD4/CD8; el valor en gatos positivos fue de 0.89, mientras que para los negativos a VIF fue de 1.71 ($p < 0.0001$). En nuestro estudio, para determinar la relación CD4/CD8 durante la infección, fue comparado el porcentaje de linfocitos T CD4+ y T CD8+ entre grupos, y fue posible observar que la disminución de esta relación, se atribuye a una reducción en el recuento de células T CD4+ y que el número de linfocitos T CD8+ no varía (Figura 20 B y C). Resultados similares fueron obtenidos por el grupo de Hoffmann-Lehmann y col. (1997) en un ensayo con gatos infectados simultáneamente con VIF y ViLeF.

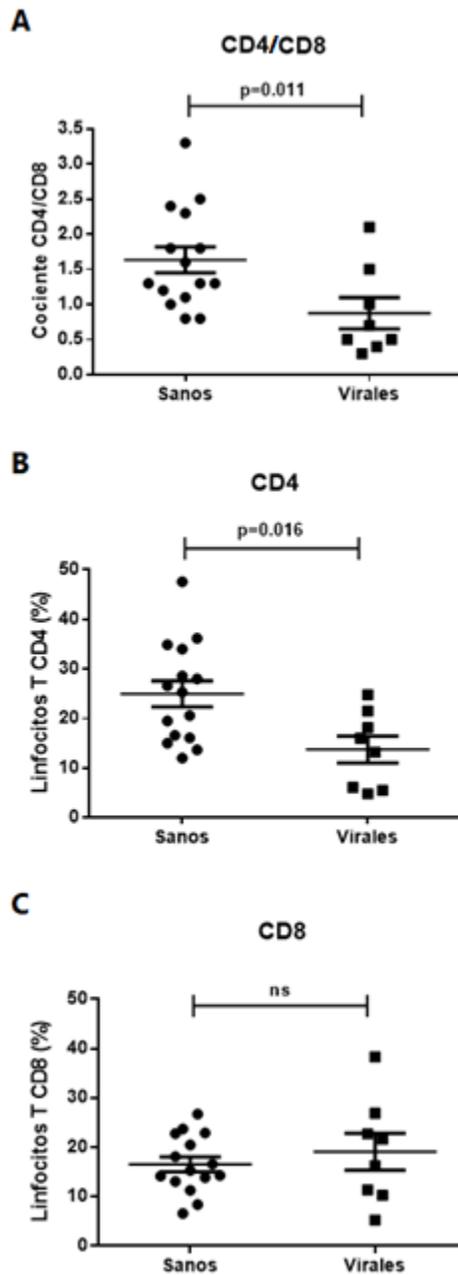


Figura 20. A. Representación del cociente CD4/CD8 para el grupo de felinos sanos y el subgrupo de felinos anémicos positivos a Vif y ViLeF (virales), donde se encuentra representada la mediana \pm SEM. B. Representación de los porcentajes de linfocitos T CD4 obtenidos para el grupo sanos y el subgrupo de virales positivos a Vif y ViLeF. C. Representación de los porcentajes de linfocitos T CD8 obtenidos para el grupo sanos y el subgrupo de virales positivos a Vif y ViLeF. Test estadístico para comparar grupos:

Mann–Whitney. Se indica el p-valor en los casos de significancia estadística; ns= no significativo.

Para que el cociente CD4/CD8 tenga un valor pronóstico de la progresión de la enfermedad viral, debe realizarse un seguimiento en el tiempo para determinar la etapa infectiva en que se encuentra el gato. Beczkowski y col. (2015), realizaron un seguimiento durante 12 meses de pacientes VIF negativos y positivos, y observaron que las diferencias en el cociente CD4/CD8 se mantuvieron entre grupos ($P < 0.0001$). Aun mas, en el trabajo realizado por Hoffmann-Lehmann y col., (1997) obsevaron que las menores tasas de CD4/CD8 se daban en pacientes VIF y ViLeF positivos en infecciones de largo plazo (80 meses), en comparación con gatos control seronegativos. En este mismo sentido, en humanos, la relación CD4/CD8 es un marcador emergente y prometedor, pero aún la evidencia no es suficiente para determinar su utilidad (Peirano y col., 2017). Dado que en esta investigación se realizó una única valoración de las poblaciones linfocitarias en un número reducido de animales, es de nuestro interés a futuro realizar un trabajo que involucre un mayor número de felinos, acompañado de un seguimiento en el tiempo que permita evaluar correctamente el estado sanitario de los felinos y la utilidad del cociente CD4/CD8 como marcador pronóstico del estado inmunitario.

8- CONCLUSIONES

El conteo automatizado de reticulocitos empleando la citometría de flujo como herramienta, mostró una alta correlación con respecto al método manual, lo que permitirá su implementación como prueba laboratorial de rutina en los pacientes que así lo ameriten.

En felinos sanos, se estandarizó por citometría de flujo el porcentaje de las diferentes poblaciones linfocitarias por primera vez en nuestro país.

Los parámetros eritrocitarios (recuento de eritrocitos, porcentaje de Hto y concentración de Hb) en el grupo de gatos con anemia no regenerativa mostró concordancia con el cuadro clínico presente. En la serie blanca el número total de linfocitos fue significativamente menor en el grupo anémico. Esto se vió reflejado en una disminución de la población de linfocitos CD18+, CD21+ y CD4+ en este mismo grupo.

En el grupo de felinos con anemia no regenerativa, la positividad viral por inmunocromatografía, fue de 6% para VIF, 17.5% para ViLeF y 23.5% para ambos virus. Asimismo, en el subgrupo de animales seropositivos la relación CD4/CD8 fue estadísticamente menor que en el grupo de felinos sanos.

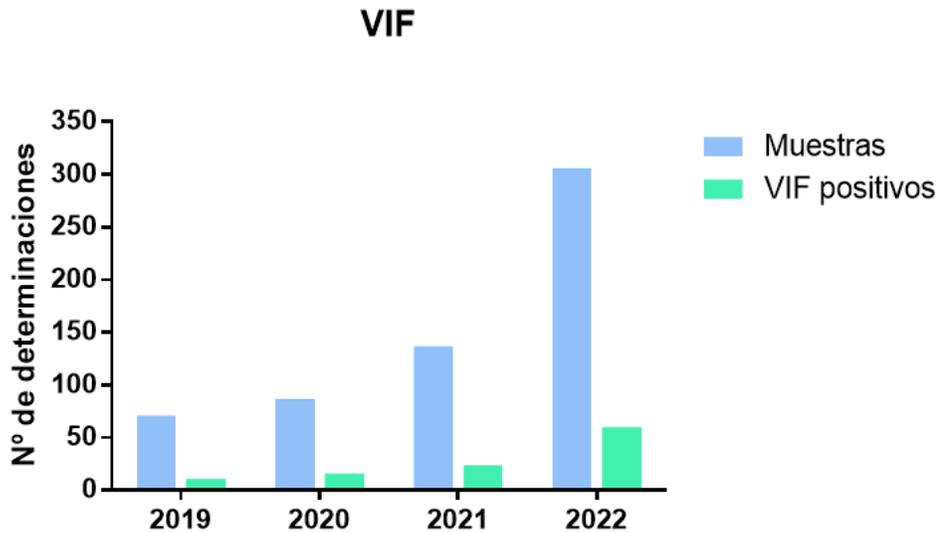
La baja viabilidad celular y la dificultad de acceso a muestras de médula ósea felinas, no nos permitió la estandarización de la citometría de flujo como herramienta diagnóstica.

La puesta a punto de la citometría de flujo en muestras felinas, es una valiosa herramienta que permitirá complementar el diagnóstico de diversas alteraciones hematológicas, como de las anemias no regenerativas y leucemias, así como, patologías linfocitarias en esta especie.

9- ANEXOS

Anexo I. Representación gráfica de la positividad a los virus VIF y ViLeF.

A



B

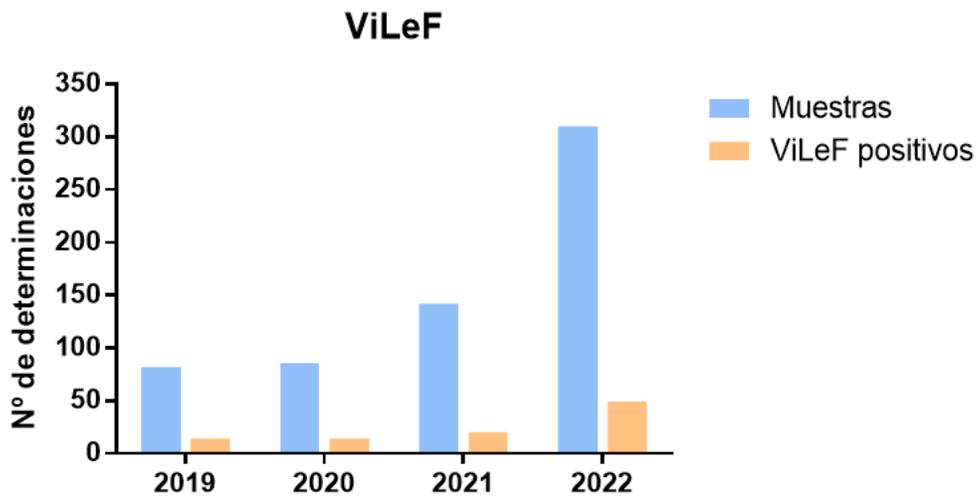


Figura A1. Representación gráfica de la positividad a VIF (A) y ViLeF (B) de todos los felinos con sospecha de enfermedades virales testeados por inmunocromatografía en el Laboratorio de Análisis Clínicos, Facultad de veterinaria, UdelaR en el periodo comprendido entre los años 2019-2022.

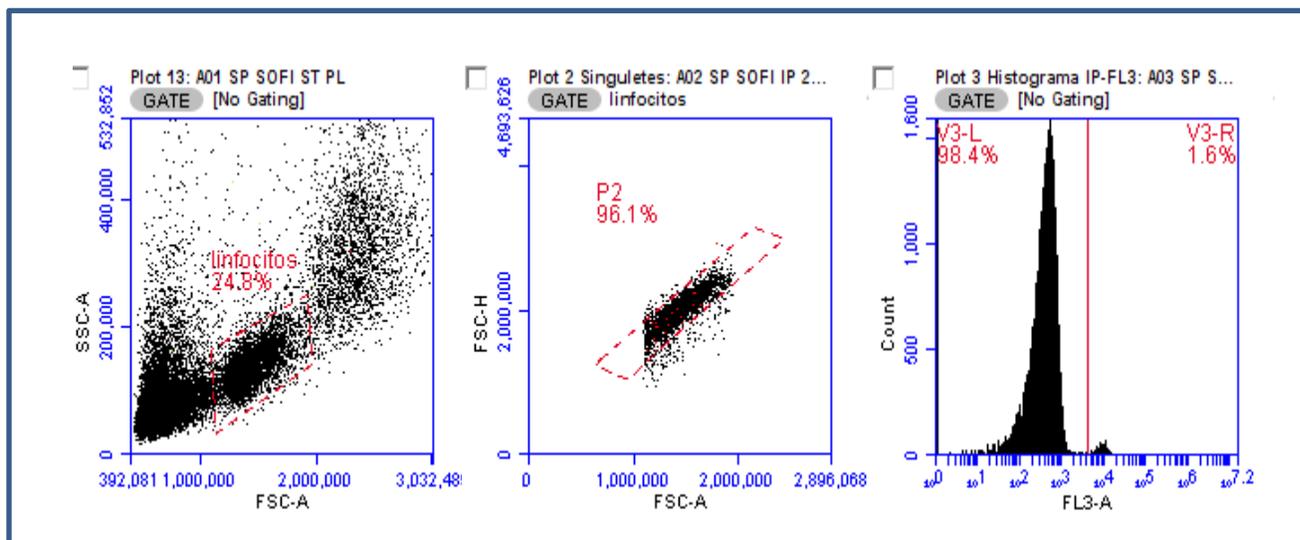
Anexo II. Anticuerpos para humanos disponibles en el Hospital de Clínicas.

MARCADOR	FLUOROCROMO	CLONA
CD235a	FITC	CLB-ery-1
CD71	APC C750	FG2-12
CD71	FITC	T56-14
CD71	dato no disponible	M-A712
CD21	C-450	B-ly4
CD3	PerCP	SK7
CD3	Pacific blue	UCHT-1
CD45	APC	J33
CD45	FITC	OCS-1
CD8	PE	B9.11
CD8	FITC	SK1
CD4	FITC	RPA-T4
CD4	APC -H7	SK3
CD5	FITC	DK23
CD20	BV421	dato no disponible
CD22	APC	5-HCL1
CD24	APC H7	ML5

Anexo III. Anticuerpos disponibles en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria.

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Especificidad	Especie	Clona	Fabricante
CD5 Rat anti dog	FITC	Linfocitos T, timocitos, algunos Linf. B y NK (low)	Canino	YKIX322.3	BIO-RAD
CD4 Rat anti dog	FITC	Linfocitos T, neutrófilos	Canino	YKIX302.9	BIO-RAD
CD8 Rat anti dog	RPE	Linfocitos T Citotóxicos	Canino	YCATESS.9	BIO-RAD
CD45 Rat anti dog	APC	Leucocitos	Canino	YKIX716.13	BIO-RAD
CD21 Mouse anti canine	RPE	Linfocitos B	Canino	CA2.1D6	BIO-RAD

Anexo IV. Estrategia de gate de la población linfocitaria en el gráfico de puntos FSC vs. SSC, selección de singuletes (P2) en el gráfico FSC-A vs. FSC-H y tinción con Ioduro de propidio (IP) en detector FL3.



Anexo V. Marcación de línea roja con anticuerpo anti-CD235a.

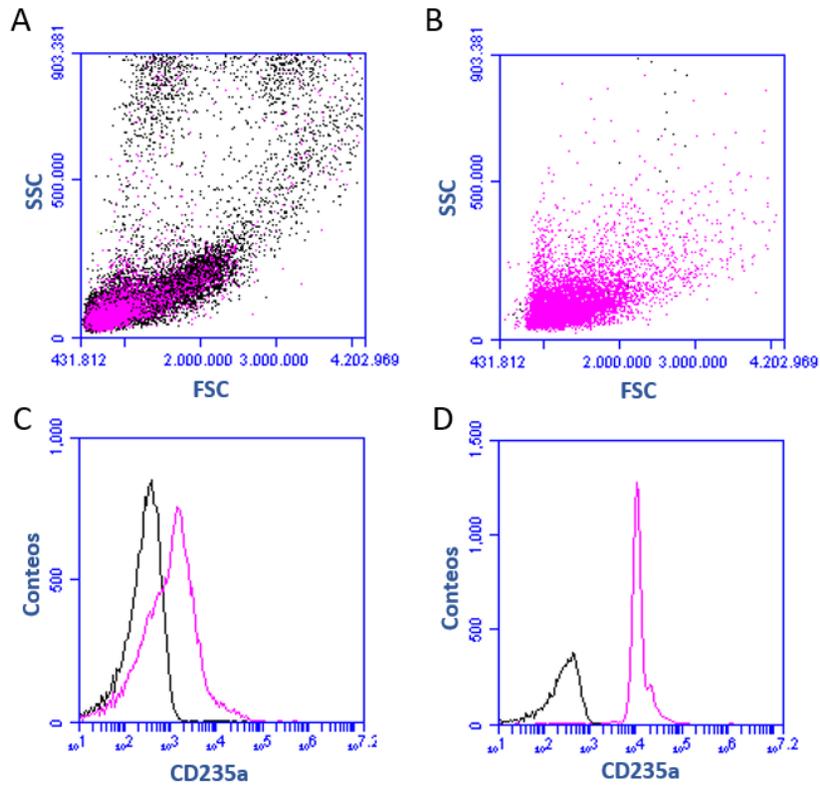


Figura A2. Población celular de la línea roja nucleada de sangre periférica humana lisada (A) y sin lisar (B), con sus histogramas correspondientes (en C y D, respectivamente), mostrando los picos de marcación negativos (negro) y positivos (rosado) a CD235a.

Anexo VI. Cuadro de diagnóstico presuntivo de anemias en el grupo de felinos anémicos

ID	Diagnóstico presuntivo de anemia
1	N/D
2	VIF y ViLeF/ Inflamación
3	Insuf. Hepática/ IRC / Inflamación/ ViLeF
4	N/D (Ecografía: Tumor en Abdomen)
5	Inflamación
6	VIF y ViLeF /Cuadro respiratorio
7	IRC / VIF
8	IRC
9	ViLeF / Inflamación
10	N/D (Serología -; PCR ViLeF +)
11	IRC/ViLeF
12	VIF y ViLeF
13	VIF y ViLeF/ Inflamación
14	Leucemia
15	Inflamación
16	N/D (Serología -; PCR ViLeF +)
17	Insuf. Hepática

N/D: no determinado

Anexo VII. Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de gatos no anémicos.

ID	IP+	CD18+	CD4+	CD8+	CD5+	CD21+	CD4+/CD8+	CD5+CD21	CD4+CD8+CD21
1	2.1	73.9	16.6	13.1	47.1	24.0	1.3	71.1	53.7
2	3.2	92.5	19.5	15.3	36.7	42.2	1.3	78.9	77.0
3	1.2	81.7	28.6	23.7	58.7	13.3	1.2	72.0	65.6
4	1.5	96.7	25.3	22.9	56.9	27.4	1.1	84.3	75.6
5	1.7	89.7	36.2	22.8	53.1	15.8	1.6	68.9	74.8
6	2	90.1	13.7	18.1	46.8	39.6	0.8	86.4	71.4
7	5.7	80.7	16.1	16.6	36.3	23.0	1.0	59.3	55.7
8	3.6	94.8	28	8.4	54.9	29.5	3.3	84.4	65.9
9	7.6	94.7	15	6.6	33.9	42.3	2.3	76.2	63.9
10	4.5	91.1	34.9	13.9	59.5	22.1	2.5	81.6	70.9
11	7.7	71.6	12	14.2	49.9	38	0.8	87.9	64.2
12	2.1	79.2	47.6	26.7	42.4	22.1	1.8	64.5	96.4
13	1.4	84.2	34	14.3	48.9	33.2	2.4	82.1	81.5
14	3.8	93.5	26.6	20.5	44.6	29.6	1.3	74.2	76.7
15	6.1	78.2	20.6	11.3	40.6	30.9	1.8	71.5	62.8

Anexo VIII. Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de gatos anémicos.

ID	IP+	CD18+	CD4+	CD8+	CD5+	CD21+	CD4+/CD8+	CD5+CD21	CD4+CD8+CD21
1	2.5	96	30.8	10	51.9	34.2	3.1	86.1	75
2	3.1	91.6	13.2	26.9	61.4	20.8	0.5	82.2	60.9
3	1.7	90.9	24.8	16.3	44.2	41	1.5	85.2	82.1
4	1	67.7	9	30.6	63.1	3.1	0.3	66.2	42.7
5	10	66.8	17.2	14	43.8	26.1	1.2	69.9	57.3
6	1.3	62.1	6.1	21.6	45.6	21.5	0.3	67.1	49.2
7	0.6	43.9	21.5	10.3	32.8	9	2.1	41.8	40.8
8	7.2	82.6	8.8	50.7	73.7	4.8	0.2	78.5	64.3
9	1.9	61.3	16	22.7	61.7	12.3	0.7	74	51.0
10	3.9	77.9	38.9	23.7	61.2	9.3	1.6	70.5	71.9
11	0.6	67.8	5.5	5.3	13.1	49.8	1.0	62.9	60.6
12	3.3	35.5	4.8	11.4	34.8	20.1	0.4	54.9	36.3
13	2.7	96.5	18.2	38.3	64.9	12.3	0.5	77.2	68.8
14	6	86.8	21.1	12.2	40.6	34.1	1.7	74.7	67.4
15	1.8	95.1	31	29.4	69.4	16.2	1.1	85.6	76.6
16	1.1	99.5	10.1	79.6	90.3	5.1	0.1	95.4	94.8
17	0.4	81.8	20.1	9	32.5	45	2.2	77.5	74.1

10- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrosio, M. B., Hennig, M. M., Nascimento, H. H. L., Santos, A. D., Flores, M. M., Figuera, R. A., Irigoyen, L. F. y Kommers, G. D. (2020). Non-Renal Lesions of Uraemia in Domestic Cats. *Journal of comparative pathology*, 180, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.09.004>.
- Aquino V. M. (2002). Acute myelogenous leukemia. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 32(2), 50–58. <https://doi.org/10.1067/mps.2002.121791>.
- Araghi, A., Nassiri, S. M., Atyabi, N., Rahbarghazi, R., y Mohammadi, E. (2014). Flow cytometric immunophenotyping of feline bone marrow cells and haematopoietic progenitor cells using anti-human antibodies. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(4), 265-274. Doi:-10.1177/1098612X13505575.
- Arjona, A., Barquero, N., Doménech, A., Tejerizo, G., Collado, V.M, Toural, C., Martín, D. y Gomez-Lucia E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) *J Fel Med Surg*, En prensa (Disponible online 24 July 2006).
- Armstrong, P. J. y Blanchard, G. (2009). Hepatic lipidosis in cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 39(3), 599–616. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.03.003>.
- Bęczkowski, P. M., Litster, A., Lin, T. L., Mellor, D. J., Willett, B. J., y Hosie, M. J. (2015). Contrasting clinical outcomes in two cohorts of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Veterinary microbiology*, 176(1-2), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.023>.
- Betting, A., Schweighause, r A., y Francey, T.(2022) Diagnostic value of reticulocyte indices for the assessment of the iron status of cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Medicine*; 36(2): 619- 628. Doi: 10.1111/jvim.16367.
- Burkhard, M.J., Dean, GA. (2003) Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Curr HIV Res.*; 1(1):15-29. Doi: 10.2174/1570162033352101. PMID: 15043209.
- Byers, C.G. (2017) Diagnostic bone marrow sampling in cats. *Feline Med Surg.*; 19(7):759-767.doi: 10.1177/1098612X17714356.
- Campbell, D.J., Rawlings, J.M., Koelsch, S., Wallace, J., Strain, J.J., Hannigan, B.M. (2004). Age-related differences in parameters of feline immune status. *Vet Immunol Immunopathol.*; 100(1-2):73-80. Doi: 10.1016/j.vetimm.2004.03.002. PMID: 15182997.

- Car, B. D. (2010). The Hematopoietic system. En D. J. Weiss y K. J. Wardrop (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (6^oed., 27-35). Ames: Wiley-Blackwell.
- Center, S. A., Baldwin, B. H., Dillingham, S., Erb, H. N. y Tennant, B. C. (1986). Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase activities in hepatobiliary disease in the cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(5), 507–510.
- Center, S. A., Slater, M. R., Manwarren, T., & Prymak, K. (1992). Diagnostic efficacy of serum alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in dogs with histologically confirmed hepatobiliary disease: 270 cases (1980-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(8), 1258–1264.
- Colado, M.; Pérez, V. (2010). *Enfermedades Infecciosas felinas*. Editorial Servet. 5 – 52.
- Comazzi, S., Gelain, M. E., Spagnolo, V., Riondato, F., Guglielmino, R., & Sartorelli, P. (2006). Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. *Veterinary clinical pathology*, 35(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00088.x>.
- Comazzi, S., Gelain, M. E., Martini, V., Riondato, F., Miniscalco, B., Marconato, L., Stefanello, D., & Mortarino, M. (2011). Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(1), 100–106. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0640.x>.
- Cornell University College of Veterinary Medicine (a). Disponible en: <http://eclinpath.com/erythropoyesishttps://ecommons.cornell.edu/handle/1813/33279>. Fecha de consulta: 13 de julio de 2023.
- Cornell University College of Veterinary Medicine (b) Disponible en: <https://eclinpath.com/hematology/tests/absolute-reticulocyte-count/> Fecha de consulta: 13 de julio 2016.
- Cornell University College of Veterinary Medicine (c) <https://eclinpath.com/hematology/anemia/assessment-regeneration/> Fecha de consulta: 22 de Agosto de 2023.
- Cornell University College of Veterinary Medicine (d). Disponible en: <https://eclinpath.com/chemistry/liver/cholestasis/alkaline-phosphatase/>. Fecha de consulta: 21 de agosto de 2023.
- Cornell University College of Veterinary Medicine (e) <https://eclinpath.com/chemistry/proteins/albumin/> Fecha de consulta: 22 de Agosto de 2023.
- Cornell University College of Veterinary Medicine <https://eclinpath.com/test-basics/reference-intervals/> Fecha de consulta 22 de Agosto de 2023.

- Costa F.V.A., Valle S.F., Machado G., Corbellini L.G., Coelho E.M., Rosa R.B. & González F.H.D. (2017). Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(12):1531-1536. Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: stella.valle@ufrgs.br.
- Couto, C.G; Nelson, R.W. (2014). *Medicina Interna de Pequeños Animales*. 5ª Ed. Barcelona, Elsevier.
- Cowell, RL. Tyler, RD; Meinkoth, JH; DeNicola, DB. (2010). *Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato*. 4ª Ed. Barcelona, Elsevier.
- Cunningham, JG. (2003) *Fisiología veterinaria*. 3ª Ed. Madrid, Elsevier.
- Chikazawa, S. and Dunning, M.D. (2016). A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. *J Small Anim Pract*, 57: 348-353. <https://doi.org/10.1111/jsap.12498>.
- Chalhoub, S., Langston, C., and Eatroff, A. (2011). Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. *Journal Feline Medicine and Surgery*. 13(9):629-40. Doi: 10.1016/j.jfms.2011.07.016. PMID: 21872790.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J (2007) Hcpidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest* 117 (7) 1755-1758.
- Elder, J. H., Lin, Y. C., Fink, E., & Grant, C. K. (2010). Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Current HIV research*, 8(1), 73–80. <https://doi.org/10.2174/157016210790416389>.
- Erber WN, McLachlan J, Cordell JL, Turley H, Reid M, Mason DY. A new monoclonal antibody (JC159) that detects glycophorin A for the diagnosis of erythroleukaemia. *Hematol Rev* 1991; 5:113-20.
- Ettinger, SJ; Feldman, EC. (2007). *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Enfermedades del perro y el gato 6ª Ed. Barcelona, Elsevier.
- Feldman, BV; Zinkl, JG; Jain, NC (2000). *Schalm's Veterinary Hematology*. 5ª Ed. Baltimore, Lippincot Williams & Wilkins.
- Fleischman, W. (2012). Anemia: Determining the Cause. Compendium: Continuing education for veterinarians. Acedido dia 22 de junho de 2015 em: http://www.vetlearn.com.secure.scihub.org/_preview?_cms.fe.previewId=a407f150-b4c0-11e1-aa85-005056ad4736&WT.mc_id=newsletter; PV062712.
- Galdo Novo, S., Bucafusco D, Diaz, L.M. y Bratanich, A.C (2016). Viral diagnostic criteria for Felineimmunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats

from Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2016 Oct -Dec; 48(4):293-297. Doi: 10.1016/j.ram.2016.07.003.

Granat, F., Geffré, A., Bourgès-Abella, N., Mortier, J., Théron, M.L., Fauchon, E., Braun, J.P., Trumel, C. (2014). Feline reference intervals for the Sysmex XT-2000iV and the ProCyte DX haematology analysers in EDTA and CTAD blood specimens. *J Feline Med Surg.*; 16(6):473-82. Doi: 10.1177/1098612X13511811. PMID: 24226754.

Gest, J., Langston, C., Eatroff, A. (2015) Iron Status of Cats with Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med.* 2015 Nov-Dec; 29(6):1488-93. Doi: 10.1111/jvim.13630. PMID: 26417695; PMCID: PMC4895665.

Giger, U. (2005) Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: *Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Textbook of Veterinary Internal Medicine.* (6Ed). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2005. Pág. 1886–1908.

Gleich, S., Hartmann, K. (2009). Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med.*; 23(3):552-8. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0303.x. PMID: 19645840.

Gleich, S. E., Krieger, S., Hartmann, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 985 – 992. DOI: 10.1016/j.gms.2009.05.019.

Grindem, C.B., Neel, J.A., Juopperi TA. Cytology of bone marrow. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002 Nov; 32(6):1313-74, VI. Doi: 10.1016/s0195-5616(02)00052-9. PMID: 12469497.

Grindem CB, Tyler R, Cowell RL. Médula ósea. En: *Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato.* 3era Edición 2009. Ed. Elsevier España.

Gruffydd-Jones, T. (2011). Feline Anaemia. Comunicação apresentada no I Encontro de formação OMV 16 e 17 de Outubro de 2011, Lisboa, Portugal.

Hasserjian, R.P., Howard, J., Wood, A., Henry, K., Bain, B. (2001) Acute erythremic myelosis (true erythroleukaemia): a variant of AML FAB-M6. *J Clin Pathol.*; 54(3):205-9. Doi: 10.1136/jcp.54.3.205. PMID: 11253132; PMCID: PMC1731380.

Hartman, K. (2006) Infección por el virus de la leucemia felina. Greene, CE En: *Enfermedades infecciosas del perro y del gato.* 3ª ed. Elsevier, 105131.

Hartmann K. 2011. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 143(3/4):190- 201.

- Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 2012 Oct 31; 4(11):2684-710. Doi: 10.3390/v4112684. PMID: 23202500; PMCID: PMC3509668.
- Harvey, J.W. (2012) *Veterinary Haematology, a Diagnostic Guide and Colour Atlas*, Ed. Elsevier.
- Hoffmann-Fezer, G., Thum, J., Ackley, C., Herbold, M., Mysliwietz, J., Thefeld, S., Hartmann, K., Kraft, W. (1992) Decline in CD4+ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 66(3):1484-8. Doi: 10.1128/JVI.66.3.1484-1488.1992. PMID: 1310760; PMCID: PMC240873.
- Hoffmann-Fezer, G., Mortelbauer, W., Hartmann, K., Mysliwietz, J., Thefeld, S., Beer, B., Thum, I., Kraft, W. (1996) Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res Vet Sci*.; 61(3):222-6. Doi: 10.1016/s0034-5288(96)90067-3. PMID: 8938851.
- Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Ossent, P., & Lutz, H. (1997). Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 4(1), 33–42. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.1.33-42.1997>.
- Hoffman WE y Solter PF. Enzimología diagnóstica de animales domésticos. En: *Bioquímica clínica de animales domésticos*, eds. Kaneko JJ, Harvey JW y Bruss M. 6ª edición. Prensa académica. 2008; págs: 351-378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.X0001-3>.
- Hosie, M.J., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C. (2009) Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*.; 11(7):575-84. Doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.006. PMID: 19481037; PMCID: PMC7129779.
- Jalla, S., Sazawal, S., Deb, S., Black, R.E., Das, S.N., Sarkar, A., Bhan, M., 2004. Enumeration of lymphocyte subsets using flow cytometry: effect of storage before and after staining in a developing country setting. *Indian Journal of Clinical and Biochemistry* 19, 95–99.
- Javard, R., Grimes, C., Bau-Gaudreault, L., Dunn, M. (2017) Acute-phase Proteins and iron status in cats with chronic Kidney disease. *J vet Intern Med*.; 31(2): 457-464. Doi: 10.1111/jvim.14661.
- Jaroensong, T.; Piamwaree, J.; Sattasathuchana, P. Effects of Chemotherapy on Hematological Parameters and CD4+/CD8+ Ratio in Cats with Mediastinal Lymphoma and Seropositive to Feline Leukemia Virus. *Animals* 2022, 12, 223. <https://doi.org/10.3390/ani12030223>.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica Texto e atlas* (11^o Ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. Pág – 221- 253.
- Knotek, Zdenek, Toman, Miroslav, Martin, Faldyna. (2000). Clinical and Immunological Characteristics of Cats Affected by Feline Infectious Peritonitis. *Acta Veterinaria Brno*. 69. 10.2754/avb200069010051.
- Kuzi, S., Segev, G., Kedar, S., Yas, E., & Aroch, I. (2017). Prognostic markers in feline hepatic lipodosis: a retrospective study of 71 cats. *The Veterinary record*, 181(19), 512. <https://doi.org/10.1136/vr.104252>.
- Lee, L.G., Chen, C.H., Chiu, L.A. (1986) Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry*. 7(6):508-17. Doi: 10.1002/cyto.990070603. PMID: 2430763.
- Levy, J., K., Scott, H., M., Lachtara, J., L. Crawford, P., C. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity, *J Am Vet Med Assoc*228:371, 2006.
- Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Little, S., Sundahl, E. Thayer V. (2008). American association of feline Practitioners feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 300 – 316.
- Lynch, A. M., Respass, M., Boll, A. E., Bozych, M., McMichael, M., Fletcher, D. J., De Laforcade, A. M., & Rozanski, E. A. (2016). Hospital-acquired Anemia in Critically Ill Dogs and Cats: A Multi-Institutional Study. *Journal of veterinary internal medicine*, 30(1), 141–146. <https://doi.org/10.1111/jvim.13650>.
- Litster, A., Lin, J. M., Nichols, J., & Weng, H. Y. (2014). Diagnostic utility of CD4%:CD8 low% T-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (FIV)-infected from FIV-vaccinated cats. *Veterinary microbiology*, 170(3-4), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.014>.
- Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, Denis KS. 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *J Feline Med Surg*. 2020 Jan; 22(1):5-30. Doi: 10.1177/1098612X19895940. PMID: 31916872.
- Lutz, H., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2009). Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(7), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.005>.
- Martini, V., Poggi, A., Riondato, F., Gelain, M. E., Aresu, L., & Comazzi, S. (2015). Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, 13(3), 281–287. <https://doi.org/10.1111/vco.12043>.

- Martini, V., Bernardi, S., Giordano, A., & Comazzi, S. (2020). Flow cytometry expression pattern of CD44 and CD18 markers on feline leukocytes. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(5), 706–709. <https://doi.org/10.1177/1040638720945670>.
- Meder, A. M.; Adagio, L. M.; Lattanzi, L. D. (2012) *El hemograma en animales pequeños*. Santa Rosa, La Pampa, ISBN: 978-950-863.
- Michelle Edwards, DVM, Feline Colangiohepatitis, Internal Medicine Compendium, November 2004 (Vol 26, No 11).
- 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. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, 23, 116–122. [Google Scholar] [CrossRef].
- Mills, J., (2000) Anaemia. In: Day, M., Mackin, A., Littlewood, J. (2000) *BSAVA Manual of canine and feline Haematology and Transfusion Medicine* (1Ed), British Small Animal Veterinary Association, pág 29- 41.
- Mira, G (2015) Hematología (Curso de especialización.) Cátedra de Patología Clínica y Enfermedades Médicas, UBA.
- Miller, A. G., Morley, P. S., Rao, S., Avery, A. C., Lana, S. E., & Olver, C. S. (2009). Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(1), 116–122. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.00210.x>
- Novotney, C.; Housman, J.; Davidson, M.G.; Nasisse, M.P.; Jeng, C.-R.; Davis, W.C.; Tompkins, M.B. (1990) Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *AIDS*, 4, 1213–1218.
- Núñez Ochoa, L.; Bouda, J. *Patología Clínica Veterinaria*. Primera edición, (2007). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. ISBN: 978-970-32-4550-5.
- Orfao, A., Schmitz, G., Brando, B., Ruiz-Arguelles, A., Basso, G., Braylan, R., Rothe, G., Lacombe, F., Lanza, F., Papa, S., Lucio, P., & San Miguel, J. F. (1999). Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clinical chemistry*, 45(10), 1708–1717.
- Park, S., Picard, F., & Dreyfus, F. (2002). Erythroleukemia: a need for a new definition. *Leukemia*, 16(8), 1399–1401. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402549>.

- Peirano, F.; Meléndez, D.; Guerra, R.; Vargas, J. I.; Fuster, F. (2017) Relación cd4/cd8 como marcador de morbilidad en pacientes VIH (+) / CD4/CD8 Ratio as morbidity marker in HIV (+) patients. *Bol. Hosp. Viña del Mar*; 73(2): 46-51.
- Perkins PC, Grindem CB. Evaluation of six cytometric methods for reticulocyte enumeration and differentiation in the cat. *Vet Clin Pathol.* 1995; 24(2):37-43. Doi: 10.1111/j.1939-165x.1995.tb00935.x. PMID: 12664432.
- Raskin, R. E., & Krehbiel, J. D. (1989). Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 194(10), 1427–1429.
- Reagan, W. J., Vap, L. M., & Weiser, M. G. (1992). Flow cytometric analysis of feline reticulocytes. *Veterinary pathology*, 29(6), 503–508. <https://doi.org/10.1177/030098589202900603>.
- Rebar, A.H (2003). Interpretación del hemograma canino y feline. Clinical Handbook Series. Nestlé Purina PetCare Company.
- Roa-Higuera, D. C., Fiorentino, S., Rodríguez-Pardo, V. M., Campos-Arenas, A. M., Infante-Acosta, E. A., Cardozo-Romero, C. C., & Quijano-Gómez, S. M. (2010). Análisis inmunofenotípico de muestras normales de médula ósea: Aplicaciones en el control de calidad en los laboratorios de citometría. *Universitas Scientiarum*, 15(3), 206-223. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc15-3.iaon>.
- Rout, E. D., & Avery, P. R. (2017). Lymphoid Neoplasia: Correlations Between Morphology and Flow Cytometry. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 47(1), 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.004>.
- Rout, ED, Labadie, JD, Curran, KM, Yoshimoto, JA, Avery, AC, Avery, PR. Immunophenotypic characterization and clinical outcome in cats with lymphocytosis. *J Vet Intern Med.* 2020; 34: 105–116. <https://doi.org/10.1111/jvim.15650>.
- Rütgen, B. C., Baszler, E., Weingand, N., Wolfesberger, B., Baumgartner, D., Hammer, S. E., Groiss, S., Fuchs-Baumgartinger, A., Saalmüller, A., & Schwendenwein, I. (2022). Composition of lymphocyte subpopulations in normal and mildly reactive peripheral lymph nodes in cats. *Journal of feline medicine and surgery*, 24(2), 77–90. <https://doi.org/10.1177/1098612X211005310>.
- Sánchez-Solé, R, Pedreira, G, Venzal, J, Fonseca-Alves, C y Pessina Serdio, P. (2022.). *The use of flow cytometry for diagnosis and immunophenotyping in chronic lymphocytic leukemia in a dog: Clinical case report.* EN: Open Veterinary Journal, 12 (4). 8 h.
- Samsel, L., & McCoy, J. P., Jr (2015). Imaging flow cytometry for the study of erythroid cell biology and pathology. *Journal of immunological methods*, 423, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.019>.

- Schalm's veterinary hematology, (2010) – 6th ed. / editors, Douglas J. Weiss, K. Jane Wardrop.
- Sellon, R. K., Hartmann, K. (2012). Feline immunodeficiency virus infection. In C.E. Greene *Infectious diseases of the dog and cat*. (4Ed.). United States of America: Elsevier. pág.136 – 149.
- Shirani, D., Nassiri, S. M., Aldavood, S. J., Seddigh, H. S., & Fathi, E. (2011). Acute erythroid leukemia with multilineage dysplasia in a cat. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 52(4), 389–393.
- Shimajima, M., Miyazawa, T., Kohmoto, M., Ikeda, Y., Nishimura, Y., Maeda, K., Tohya, Y., & Mikami, T. (1998). Expansion of CD8alpha+beta- cells in cats infected with feline immunodeficiency virus. *The Journal of general virology*, 79 (Pt 1), 91–94. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-1-91>.
- Stokol, T., (2010) Immune-mediated anemia in cats in: Weiss, D., J., Wardrop K., J. (2010). *Schalm's Veterinary Hematology* (6^aEd) Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons inc. Pág 226-232.
- Studer N, Lutz H, Saegerman C, Gönczi E, Meli ML, Boo G, Hartmann K, Hosie MJ, Moestl K, Tasker S, Belák S, Lloret A, Boucraut-Baralon C, Egberink HF, Pennisi MG, Truyen U, Frymus T, Thiry E, Marsilio F, Addie D, Hochleithner M, Tkalec F, Vizi Z, Brunetti A, Georgiev B, Ludwig-Begall LF, Tschuor F, Mooney CT, Eliasson C, Orro J, Johansen H, Juuti K, Krampfl I, Kovalenko K, Šengaut J, Sobral C, Borska P, Kovaříková S, Hofmann-Lehmann R. Pan-European Study on the Prevalence of the Feline Leukaemia Virus Infection - Reported by the European Advisory Board on Cat Diseases (ABCD Europe). *Viruses*. 2019 Oct 29; 11(11):993. Doi: 10.3390/v11110993. PMID: 31671816; PMCID: PMC6893802.
- Suárez, V.M; Lázaro, O. del Valle Pérez, Díaz Domínguez, G; Macías Abraham, C. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter*. 2015;31(3):242-253.
- Sykes JE. Feline Immunodeficiency Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 2014:209–23. Doi: 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00021-1. Epub 2013 Aug 26. PMCID: PMC7152317
- Sykes, J. E., & Hartmann, K. (2014). Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 224–238. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3>.
- Szilasi A, Dénes L, Krikó E, Heenemann K, Ertl R, Mándoki M, Vahlenkamp TW, Balka G. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. *JFMS Open Rep*. 2019 Dec 10; 5(2):2055116919892094. Doi: 10.1177/2055116919892094. PMID: 31839979; PMCID: PMC6904780.

- Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T., & Gallego, L. S. (2009). Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). *Veterinary clinical pathology*, 38(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00099.x>.
- Tasker, S., (2012). Diagnostic approach to anaemia in cats. Companion animal practice, in Practice, vol. 34/ 370-381 DOI: 10.1136/inp.e44889.
- Thrall Mary Anna, Weiser Glade, Allison Robin W., Campbell Terry W, (2012). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Second Edition, Editorial WileyBlackwell.
- Torrente, C., Manzanilla, E. G., Bosch, L., Fresno, L., Rivera Del Alamo, M., Andaluz, A., Saco, Y., & Ruiz de Gopegui, R. (2015). Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 25(5), 611–619. <https://doi.org/10.1111/vec.12340>.
- Tvedten, H. (2010) in: Weiss, D., J., Wardrop K., J. (2010). Schalm's Veterinary Hematology (6a Ed) Wiley-Blackwell, John Wiley& Sons inc. Pág 152-161; 1067-1073.
- Tritschler, C., Mizukami, K., Raj, K., & Giger, U. (2016). Increased erythrocytic osmotic fragility in anemic domestic shorthair and purebred cats. *Journal of feline medicine and surgery*, 18(6), 462–470. <https://doi.org/10.1177/1098612X15587574>.
- Turinelli, V., Gavazza, A. (2018). Retrospective study of 152 feline cytological bone marrow examinations: preliminary classification and ranges. *J Feline Med Surg.*; 20(12):1158-1168. Doi: 10.1177/1098612X18757602. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29451443.
- Valle, C.S. Farias, N.C.B. Duda, G. Machado, F.A. Costa, RS (2019) Correlação entre as contagens de reticulócitos manual e automática em amostras de felinos anêmicos [Correlation between manual and automatized values of reticulocyte count in anemic feline samples] S.F. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS 2Médica veterinária autônoma – Porto Alegre.
- van de Loosdrecht, A. A., Ireland, R., Kern, W., Della Porta, M. G., Alhan, C., Balleisen, J. S., Bettelheim, P., Bowen, D. T., Burbury, K., Eidenschink, L., Cazzola, M., Chu, S. S., Cullen, M., Cutler, J. A., Dräger, A. M., Feuillard, J., Fenaux, P., Font, P., Germing, U., Haase, D., ... Westers, T. M. (2013). Rationale for the clinical application of flow cytometry in patients with myelodysplastic syndromes: position paper of an International Consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia & lymphoma*, 54(3), 472–475. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.718341>.
- Vapniarsky, N., Simpson, D. L., Arzi, B., Taechangam, N., Walker, N. J., Garrity, C., Bulkeley, E., & Borjesson, D. L. (2020). Histological, Immunological, and Genetic Analysis of Feline Chronic Gingivostomatitis. *Frontiers in veterinary science*, 7, 310. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00310>.

- Villiers, E. (2009) *Diagnóstico de Laboratorio en pequeños animales*. 2ª Ed. Barcelona, Ediciones S.
- Westman, M.A., Malikb, R, Norrisa, J.M. (2019). Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. WeissDJ. Aplastic anemia in cats - clinicopathological features and asóciate disease conditions 1996 - 2004. *Fel Med Surg* 2007; [julio 28 de 2008]. URL: <http://www.sciencedirect.com>.
- Weiss D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004) *J Vet Intern Med*. 2006; 20:955–961.
- Weiss, DJ; Wradrop, K.J: (2010) *Schalm's veterinary hematology*. – 5th edition, Ed. Wiley-Blackwell.
- White, C., Reine, N., (2009a). Feline nonregenerative anemia: Diagnosis and treatment. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*.
- White C, Reine, N. (2009 b). Feline nonregenerative anemia: Pathophysiology and etiologies. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*. Acedido em 21 de Junho de 2015 em: <http://www.compendiumVet.com/2009/June>.
- Willard MD, Tvedten H; Turnwald GH (2004): *Diagnóstico clínico por métodos de laboratorio en pequeños animales*, 4ª ed. Editorial Inter-Médica.
- Winzelberg Olson S, Hohenhaus AE. Feline non-regenerative anemia: Diagnostic and treatment recommendations. *J Feline Med Surg*.2019 Jul;21(7):615-631. Doi: 10.1177/1098612X1.
- Wittwer F. (2021) *Manual de patología clínica veterinaria*, 2º Edición.
- Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*.2016 Jan; 90(1):47-53. Doi: 10.1002/cyto.b.21239. Epub 2015 May 29.
- Zawie DA, Garvey MS (1984) *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1984; 14(6):1201-30. Feline hepatic disease.
- Zeppa, P., Marino, G., Troncione, G., Fulciniti, F., De Renzo, A., Picardi, M., Benincasa, G., Rotoli, B., Vetrani, A., Palombini, L., 2004. Fine needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and sub-classification of non-Hodgkinlymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestion. *Cancer* 102, 55–65.
- Zini G. Diagnostic and prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med* 2017; 37:465-474. Doi: 10.3343/alm.