

Neoplasias hemopoyéticas en 10 gatos positivos al virus leucemia felina

Haemopoietic neoplasm in 10 cats positive to feline leukaemia virus

L Muñoz*

SUMMARY

Presence of the antigen of the feline leukaemia virus in serum of cats naturally infected was observed in Chile in 1989, using an ELISA test. This virus induces neoplastic as well as non-neoplastic alterations. The lymphoproliferative neoplasms are more common than the myeloproliferative haemopoietic neoplasms. Haemograms and myelograms stained with Giemsa and cytochemical stains were used for the diagnosis of the altered cellular line.

The objective of this investigation was to contribute to the knowledge of the haemopoietic neoplastic diseases of cats positive to the virus.

Ten cats positive to the feline leukaemia virus and with clinical signs were used. Samples of blood and bone marrow were processed with both stains. The cytochemical stains used were peroxidase, the naphthol AS-D chloroacetate esterase and the alpha naphthyl acetate esterase. Four healthy cats, negative to the virus were used as a control group.

The haemograms and myelograms results showed that 7/10 were lymphoma, 3 of them also presented alterations in the neutrophilic granulocytic cells; 2/10 presented erythremic myelosis and 1/10 eosinophilic leukaemia.

Blood cells stained with peroxidase and naphthol AS-D chloroacetate esterase were higher in number in the positive cats than in the control group, which indicates the existence of a larger number of immature cells in blood. The results regarding bone marrow, were similar in positive and control cats.

The diagnoses of haemopoietic neoplasms were confirmed by the severity of anemia, the presence of immature cells in blood and the larger amount of cells positive to the different cytochemical stains.

Palabras clave: virus leucemia felina, neoplasma hemopoyético, tinciones citoquímicas.

Key words: feline leukaemia virus, haemopoietic neoplasms, cytochemical stains.

INTRODUCCION

En Chile, al igual que en otros países, la población felina ha ido en aumento, por lo tanto también sus enfermedades, siendo la leucemia viral la patología de mayor morbilidad y mortalidad en los gatos y la principal causa de las neoplasias hemopoyéticas en este animal (Cotter 2000, Levy 2000).

En 1989 se diagnosticó serológicamente esta patología en Chile y desde ahí a la fecha se siguen utilizando las pruebas de ELISA para el diagnóstico de esta enfermedad (Correa y col 1989).

El virus de la leucemia felina (ViLeF) pertenece al género retrovirus mamífero tipo C. Es un virus ARN que posee en su núcleo la enzima transcriptasa reversa que le permite pasar el material genético a ADN y formar un provirus; además posee varios antígenos, siendo de importancia el antígeno p27, el cual es soluble y es el que se detecta con las pruebas diagnósticas (Murphy y col 1995).

Las neoplasias hemopoyéticas se clasifican en dos grandes grupos: linfoproliferativas y las mieloproliferativas. Las mieloproliferativas se clasifican en subgrupos, de acuerdo al criterio FAB (Convención Francesa, Americana y Británica) humano, designándola con el nombre de la célula neoplásica que está involucrada y además con la letra M seguida de un número que va de 0 a 7, de acuerdo a la etapa de diferenciación de la célula neoplásica predominante (Jain y col 1991).

Para poder clasificar dichas neoplasias es necesario realizar tinciones citoquímicas tanto de los hemogramas como de los mielogramas (Grindem y col 1985, Facklam y Kociba 1986). Existen varias reacciones citoquímicas que permiten en menor o mayor grado la identificación de los diferentes tipos de blastos (Jain 1970, Facklam y Kociba 1986, Artigas y col 1991, Jain y col 1991, Grindem 1996). Las más comunes son las tinciones de PAS (ácido peryódico de Schiff); las mieloperoxidasas; Sudán negro B y dentro de las más específicas se utilizan las esterasas específicas (cloroacetato naftol AS-D) y no específicas (acetato alfa-naftil); la fosfatasa alcalina y ácida (Grindem y col 1985, Artigas y col 1991, Jain y col 1991).

Las peroxidasas son enzimas que están principalmente en los gránulos primarios (lisosomas) de los granulocitos

Aceptado: 03.01.05.

* Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Correo 15, Casilla 20, La Granja, Santiago, Chile. lmunoz@uchile.cl

neutrófilos (desde el estado de mieloblasto a mielocito) y son de utilidad para diferenciar los precursores mieloides (Grindem y col 1985, Facklam y Kociba, 1986). Esta prueba se identifica como positiva cuando se observan gránulos pequeños, uniformes, de color rojo o café brillante en el citoplasma de la célula en cuestión (Jain 1970, Grindem y col 1985).

Las esterasas específicas y no específicas se basan en la capacidad que tienen las enzimas leucocitarias de hidrolizar sustratos sintéticos derivados del naftaleno. Así las esterasas específicas usan como sustrato el cloroacetato naftol AS-D, reaccionando fuertemente los mieloblastos, progranulocitos y los basófilos mielocitos y en menor intensidad los neutrófilos maduros, no reaccionando los eosinófilos, monocitos, linfocitos y eritrocitos (Facklam y Kociba 1986, Artigas y col 1991). En las reacciones positivas se observa una granulación azul en el citoplasma y todos los núcleos se presentan verdes (Jain 1970). Las tinciones con esterasas no específicas usan acetato alfa-naftil o butarato alfa-naftil para distinguir los monocitos (Artigas y col 1991), donde se observa el citoplasma de color café claro con pequeños gránulos café-rojizos (Grindem y col 1985, Facklam y Kociba 1986).

El objetivo de este estudio es contribuir al diagnóstico de algunas neoplasias hemopoyéticas del felino doméstico, describiendo las características citológicas y citoquímicas de los hemogramas y mielogramas de gatos enfermos positivos al ViLeF.

MATERIAL Y METODOS

Animales: Se utilizaron 10 gatos positivos al virus leucemia, diagnosticado por la prueba de ELISA (Synbiotics) y con signos de enfermedades crónicas. Además se utilizaron como control cuatro gatos sanos y negativos a la prueba de ELISA.

Hemograma: A todos los animales se les extrajo sangre de la vena yugular (1 ml) y se realizaron extendidos para posteriormente teñirlos con Giemsa y con las tinciones citoquímicas.

Mielograma: A todos los animales se les extrajo médula ósea (menos de 0,5 ml) a partir de una aspiración realizada en la fosa trocantérica del fémur y se realizaron extendidos para posteriormente teñirlos con Giemsa y con las tinciones citoquímicas.

Tinciones citoquímicas: A los extendidos de sangre y de médula ósea de los pacientes sanos y positivos al ViLeF se les aplicaron las siguientes técnicas citoquímicas: peroxidasa; cloroacetato naftol AS-D estearasa (estearasa específica) y acetato alfa-naftil estearasa (estearasa no específica). Para todas ellas se utilizaron reactivos comerciales Sigma®.

La prueba de la peroxidasa se basa en que la peroxidasa oxida la bencidina en presencia de H_2O_2 , formándose un color café oscuro en el sitio de la actividad de la enzima. Se utilizó sangre sin anticoagulante para mantener la actividad de la enzima, fijando los extendidos durante 30 segundos en una solución de formoetanol a temperatura ambiente; se lavaron con agua corriente por dos minutos y se secaron en oscuridad por 10 minutos. Luego se procedió a la tinción con una solución que contenía Buffer Trizmal diluido, un indicador de peroxidasa y una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, durante 30 minutos en baño termorregulado en oscuridad. Pasado este período se lavó con agua corriente por 15 segundos y se contratiñó con hematoxilina por 10 minutos. La reacción positiva se visualizó por la formación de gránulos café oscuro en el citoplasma de los neutrófilos y sus precursores. Los monocitos dieron una leve reacción, mientras que los linfocitos y basófilos fueron negativos.

Para las reacciones de cloroacetato naftol AS-D (estearasa específica) y acetato alfa-naftil esterasas (estearasa no específica) se fijaron las muestras en una solución de citrato, acetona y formaldehído al 37% durante 30 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron éstas con agua desionizada durante 45 a 60 segundos y sin secar se sometieron a las distintas tinciones. Para la tinción de cloroacetato naftol AS-D estearasa se utilizó 0,2 ml de nitrito de sodio, 0,2 ml de rojo rápido LB, 1 ml de Trizmal concentrado y 0,2 ml de cloroacetato naftol AS-D en un vaso Coplin durante 15 minutos a 37° C, protegido de la luz. Luego se lavó con agua desionizada por dos minutos y se contratiñó con hematoxilina. Para la tinción de acetato alfa-naftil estearasa se utilizó 0,2 ml de nitrito de sodio, 0,2 ml de azul rápido BB, 1 ml de Trizmal concentrado y 0,2 ml de acetato alfa-naftil, en un vaso Coplin durante 30 minutos en estufa a 37° C protegido de la luz. Luego se lavaron las muestras con agua desionizada por dos minutos y se contratiñeron con hematoxilina.

La actividad de la cloroacetato naftol AS-D estearasa se considera específica para la línea celular de los granulocitos, mostrando en el sitio de actividad una granulación rojo brillante. No muestran actividad positiva los monocitos ni linfocitos. La acetato alfa-naftil estearasa es una enzima que se detecta en los monocitos y macrófagos, mediante una granulación negra; esta actividad está ausente en los granulocitos y ocasionalmente dan como positivos los linfocitos.

En los extendidos de sangre se contaron un mínimo de 100 células, en cambio en los de médula ósea se contaron 200 células. Los resultados se expresaron en porcentajes.

RESULTADOS Y DISCUSION

De los 10 gatos estudiados, siete presentaron desórdenes linfoproliferativos (linfoma) y tres desórdenes mieloproliferativos (dos mielosis eritrémica y uno leucemia eosinofílica).

De los gatos con linfoma dos presentaron una anemia severa (VGA < 10%), en cuatro la cuenta de leucocitos estaba normal y sólo uno presentó leucocitosis. De estos casos tres presentaron células en bizarra, vacuoladas, basofílicas y con maduración asincrónica (cuadro 1). En los mielogramas tres gatos presentaron células linfoides en un alto porcentaje y en dos gatos no se obtuvo muestra adecuada de médula ósea (cuadro 2).

Las tinciones citoquímicas resultaron negativas en la mayoría de los casos, sólo la peroxidasa tiñó en un alto porcentaje a las células granulocíticas neutrófilas de los gatos que presentaron desviación a la izquierda.

Dos gatos presentaron mielosis eritrémica o síndrome mielodisplásico, con anemia severa, neutropenia con granulocitos inmaduros y con una relación mieloide eritroide disminuida (cuadros 1 y 2). Las tinciones citoquímicas resultaron negativas (sin tinción).

Un gato presentó leucemia eosinofílica, con anemia moderada y eosinofilia leve, pero con un aumento de eosinófilos en médula ósea y la relación M:E 2,6:1 (cuadros 1 y 2). Con la tinción de cloroacetato naftol AS-D se observaron células teñidas tanto en sangre como médula ósea.

Dentro de las neoplasias hemopoyéticas de gatos positivos al virus leucemia son de mayor frecuencia los desórdenes linfoproliferativos que los mieloproliferativos (Hardy 1982, Ban y col 1995, Lappin, 1997).

Los linfomas se presentaron en gatos jóvenes con un promedio de edad de 3,5 años y no presentaron al hemograma características diagnósticas; se encontraron desde leucopenias a leucocitosis, como también linfopenias como linfocitosis y anemias en el 75% de los casos. Sólo tres de estos gatos presentaron células alteradas (bizarra, mitosis) en sangre. Estos resultados son comparables a los descritos por Jain (1993) que estima que sólo el 10% de los linfomas se acompañan de un cuadro leucémico propiamente tal y que los cambios hematológicos asociados a los linfomas son variables.

La médula ósea en los casos de linfoma se encuentra infiltrada en forma masiva con linfocitos neoplásicos, los cuales se caracterizan por presentar diferentes tamaños y estados de maduración, encontrándose en el gato N° 10 un 90% de linfocitos. También se observa en ella una disminución de la eritropoyesis y una anomalía en la granulopoyesis, lo cual es debido a la infección del ViLeF más que a la infiltración por linfocitos (Jain 1993).

Cuadro 1. Hemogramas de los 10 gatos con neoplasias hemopoyéticas positivos al virus leucemia.

Haemograms of 10 cats positive to feline leukaemia virus and with haemopoyetic neoplasm.

Gato N°		Valores Ref.	3	4	6	7	8	9	10	1	2	5
Diagnóstico			L	L	L	L	L	L	L	LE	ME	ME
Eritrocitos	ul	5,0-10			1,6		2,8	2,9		2,36	2,8	0,6
VGA	%	24-45	20	29	5	26	13	12	8	16	15	6
Hb	g/dl	8,0-15	5,8	9	1,8	10	5	4	2		5	2,1
CHCM		30-36	29	31	36	38	35	33			31	35
VCM	fl	39-55			31,2		46,4	41,3		67,8	53,5	100
Eri. Nuclea.	%		0	1	2	0	5	0	1	0	1	1000
Reticulocitos	ul				13120		45280			33040	1E+05	
Reticulocitos	%	0,2-1,6			0,8		1,6			1,4		
Leucocitos		5500-19500	14600	4900	8873	550	21400	3950	10250	4750	5900	8418
Mielocitos	ul						2826	39	410			
	%						13,2	1	4			
Metamielocitos	ul						1284	79	512	47		0
	%						6	2	5	1		0
Baciliforme	ul	0-300	146		532	44	1712	592	717	428		522
	%		1		6		8	15	7	9		6
Neutrófilos	ul	2500-12500	11534	1372	6386	198	6741	2607	2050	1947	4071	5262
	%		79		72		31,5	66	20	41	69	62
Linfocitos	ul	1700-7000	2774	3479	1685	143	8346	198	3997	760	1652	2630
	%		19	0	19		39	5	39	16	28	31
Monocitos	ul	0-850	0	49	266	154	321	79	410	0	0	0
	%		0	1	3		1,5	2	4	0	0	0
Eosinófilos	ul	0-1500	146	0	0	22	428	0	102	1568	177	0
	%		1				2		1	33	3	0
No clasif.							642	355	2050			0
							3	9	20			0

L: linfoma; LE: leucemia eosinofílica; ME: mielosis eritrémica

Cuadro 2. Mielogramas de 10 gatos con neoplasias hemopoyéticas positivos al virus leucemia.

Myelograms of 10 cats positive to feline leukaemia virus and with haemopoietic neoplasm.

Diagnóstico	Valores Referencia	3	4	6	7	8	9	10	1	2	5
		L	L	L	L	L	L	L	LE	ME	ME
Mieloblasto	%	0,0	1,1	0	–	1,5	–	0	1,5	3,2	0,5
Progranulocito	%	1,7	1,1	0	–	3,2	–	0	4,0	0,9	2,1
Mielocitos	%	4,3	5,2	4,9	–	4,5	–	0	33,9	1,9	0
Metamielocitos	%	10,0	4,0	13,2	–	1,0	–	1,0	1,5	2,4	0
Baciliformes	%	14,4	22,2	12,6	–	4,7	–	2,8	12	3,9	0
Segmentados	%	12,8	26,9	23,1	–	7,1	–	6,2	9,6	3,7	0,5
Total Células mieloides	%	45,8	61	49	X	22	X	10	63	16	3,2
Rubriblasto	%	0,1	0,5	0,7	–	0	–	0	0	0,5	0
Prorubricito	%	1,0	0,5	0,8	–	0	–	0	0	3,0	3,7
R. basofílico	%	4,0	11,5	7,4	–	5,8	–	0	6,3	4,2	3,2
R. policromático	%	17,5	5,7	15,6	–	3,1	–	0	2,4	26,8	18,8
R. normocromático	%	5,5	18,5	15,3	–	11,1	–	0	15,1	16,3	16,1
Total Células eritroides	%	28,7	37	40	X	20	X	0	24	51	42
Relación M:E		1,6	1,6	1,2	–	1,1	–	0	2,6	0,3	0,0
Otras células (linfocitos)	%	25,4	1,7	11	X	58	X	90	13	33*	54,8*

X = contaminada con sangre, pocas células.

* = 90-97% de células destruidas.

L: linfoma; LE: leucemia eosinofílica; ME: mielosis eritrémica.

Las tinciones utilizadas no tiñen linfocitos, por lo tanto en el gato N° 10 éstas fueron negativas, sin células teñidas; en los otros gatos se observaron diferentes porcentajes de tinciones con la peroxidasa y la cloroacetato naftol As-D, las cuales tiñeron sobre un 50% de las células totales en los gatos con desviación a la izquierda, lo que indica que pertenecían a la línea de los granulocitos neutrófilos.

Lo adecuado al realizar el diagnóstico de los linfomas es utilizar el sistema de estadificación TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis) desarrollado por la Organización Mundial de la Salud, encontrándose según ella tres gatos (N°s 6, 8, 10) en el Grado V (compromiso de médula ósea), dos (N°s 3, 4) en el Grado IV (afección generalizada de ganglios más hepatoesplenomegalia) y dos (N°s 7 y 9) que también se clasificaron en el grado IV, porque no se pudo obtener una muestra adecuada de médula ósea para su completa clasificación.

Se denominan desórdenes mieloproliferativos cuando se presenta una proliferación anormal de una o varias líneas celulares originarias de médula ósea, debido probablemente al origen común que éstas tienen (*Stem cell pluripotencial*); así puede existir una proliferación anormal de los precursores eritroides, mieloides o granulo-

cíticos, monocíticos y trombocíticos (Shelton y Linenberger 1995).

Los desórdenes mieloproliferativos ocurren principalmente en gatos positivos a ViLeF con un promedio de tres a cuatro años de edad, de ambos sexos (Jain 1993, Shelton y Linenberger 1995, Muñoz y col 2000). En este estudio el promedio de edad de los gatos fue de cuatro años y todos eran machos.

Los dos gatos (N°s 2 y 5) que presentaron desórdenes mieloproliferativos, al hemograma tenían anemia severa (VGA < 10%) con un gran número de eritrocitos nucleados (2.100/100L) con cuerpos de Howell-Jolly, células redondas, con núcleos que ocupaban la mayor parte del citoplasma, cromatina densa, citoplasma basófilo, macroplaquetas y no había reticulocitos.

En el análisis de los mielogramas se observó bastante disminuida la relación mieloides:eritroide, siendo lo normal 1,6:1 y en estos casos fue de 0,3:1 y 0,08:1.

Se ha reportado que las mielosis eritrémicas o síndromes mielodisplásico progresan a eritroleucemia y de ahí a leucemias granulocíticas agudas en lapsos de semanas (Comazzi y col 2000).

Los síndromes mielodisplásicos se caracterizan por presentar bicitopenias o pancitopenias periféricas deriva-

das de cambios displásicos en los eritrocitos, células mieloides y megacariocitos de médula ósea. Esta última puede ser normocelular o hiper celular (Shimoda y col 2000, Hisasue y col 2001). Los síndromes mielodisplásicos progresan a una leucemia mieloides aguda, por lo tanto se les considera como estados preleucémicos (Harvey y col 1978, Evans y Gorman 1987). Se describe este síndrome en gatos jóvenes o de edad media infectados con el virus leucemia felina (Jarret y col 1971, Jain 1993, Hisasue y col 2001).

Al analizar el mielograma del gato N° 2 se observó que la serie eritroide era mayor al 50% del total de células nucleadas (51%) y los mieloblastos corresponden al 20% de las células mieloides, lo que corresponde a una anemia refractaria con exceso de blastos, dentro de la subclasificación del síndrome mielodisplásico de humanos (Hisasue y col 2001).

Las tinciones citoquímicas resultaron negativas en estos casos, lo que es debido a que las tinciones utilizadas no son marcadores de eritrocitos, por otra parte se describe que la tinción PAS es de utilidad en el ser humano. El que no hayan reaccionado a las tinciones los mieloblastos del gato N° 2, se explicaría porque en estos síndromes los cambios displásicos que suceden en la célula los alteraría, dando negativo (Comazzi y col 2000).

El gato N° 1 presentó una leucemia eosinofílica, basándose en la anemia, en una leucopenia con un 33% de eosinófilos, en la gran cantidad de eosinófilos en médula ósea, ya que ellos correspondían a un 34% de las células mieloides de médula, siendo lo normal un 2,1% y la relación mieloides:eritroide fue de 2,6:1.

La literatura menciona que es más frecuente el síndrome hipereosinofílico negativo al ViLeF que la leucemia eosinofílica en gatos positivos al ViLeF, aunque en un estudio se inocularon gatos con una cepa del virus leucemia (Lewis y col 1985) y presentaron leucemia eosinofílica.

Las tinciones citoquímicas dan negativo en los eosinófilos normales, pero se describe que dan positivo los eosinófilos de pacientes leucémicos a la cloroacetato naftol AS-D (Facklam y Kociba 1996), reaccionando en este estudio un 70% en sangre y 55% en médula ósea.

Para realizar los diagnósticos de neoplasias hemopoyéticas es imprescindible tomar muestras de sangre y médula ósea conjuntamente, ya que se describe que estas patologías son dinámicas en el tiempo; además, para lograr una clasificación adecuada de las neoplasias hemopoyéticas es necesario utilizar una mayor batería de técnicas citoquímicas.

RESUMEN

En Chile se diagnosticó la presencia del antígeno del virus leucemia felina en el suero de gatos naturalmente infectados en 1989 mediante la prueba de ELISA.

Este virus produce enfermedades neoplásicas como no neoplásicas. Dentro de las neoplasias hemopoyéticas, las linfoproliferativas son más frecuentes que las mieloproliferativas. Para realizar un diagnóstico certero de la línea celular alterada se deben realizar hemogramas y mielogramas con tinciones de rutina (Giemsa) y tinciones específicas. Estas últimas se basan en reacciones citoquímicas que permiten identificar los diferentes blastos.

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento y diagnóstico de las neoplasias hemopoyéticas en gatos positivos a este virus.

Para ello se utilizaron 10 gatos positivos al virus leucemia y además con signología clínica a los cuales se les extrajo una muestra de sangre y de médula ósea para realizar dichas tinciones. Las tinciones citoquímicas utilizadas fueron la peroxidasa, cloroacetato naftol AS-D estearasa y acetato alfa-naftil estearasa. Además, se utilizaron como controles cuatro gatos clínicamente sanos y negativos al virus leucemia.

Al analizar los hemogramas y mielogramas con tinciones corrientes y tinciones citoquímicas se encontró que 7/10 se clasificaron como linfoma, donde tres de ellos además presentaron alteración de la línea granulocítica neutrofílica; 2/10 presentaron mielosis eritrémica y 1/10 leucemia eosinofílica.

Resultaron una mayor cantidad de células positivas (teñidas) con peroxidasa y cloroacetato naftol AS-D estearasa en sangre en los gatos enfermos que en los controles, lo que indica que existe un mayor número de células inmaduras circulando. Los resultados de las tinciones citoquímicas en médula ósea fueron semejantes entre los gatos sanos y enfermos.

Algunos puntos que ayudan al diagnóstico de las neoplasias hemopoyéticas son la severidad de la anemia, la aparición de células inmaduras en sangre y la mayor cantidad de células positivas a las diferentes tinciones citoquímicas.

REFERENCIAS

- Artigas G, J Del Río, M Del Río, E Páez, E Yáñez, C Vittini. 1991. Utilidad de las estereasas combinadas en la diferenciación de las leucemias agudas no linfoblásticas. *Rev Chil Cs Med Biol* 1, 43-47.
- Ban M, C Olsen, F Scott. 1995. Feline viral diseases. En: Ettinger, S., Feldman, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed, W.B. Saunders. Philadelphia, USA. v. 1.
- Comazzi S, S Paltrieri, M Caniatti, S De Dominici. 2000. Case report: Erythremic myelosis (AML6er) in a cat. *J Fel Med Sci* 2, 213-215.
- Correa J, T Segovia, J Rojas. 1989. Detección de la infección por el virus leucemia felina mediante técnica de ELISA en Santiago, Chile. *Arch Med Vet* XXI, 48-50.
- Cotter S. 2000. Neoplasia viral felina. En: Greene, C. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos*. 2th ed. México, McGraw-Hill Interamericana, pp. 78-91.
- Evans R, N Gorman. 1987. Myeloproliferative disease in the dog and the cat: definition, aetiology and classification. *Vet Rec* 121, 437-443.
- Facklam R, G Kociba. 1986. Cytochemical characterization of feline leukemic cells. *Vet Pathol* 23, 155-161.
- Grindem C, J Stevens, V Perman. 1985. Cytochemical reactions in cells from leukemic cats. *Vet Clin Pathol* 14(3), 6-12.
- Grindem C. 1996. Blood cell markers. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 26(5), 1043-1063.

- Hardy D. 1982. Immunopathology induced by the Feline Leukemia Virus. *Springer Semin Immunopathol* 5, 75-106.
- Harvey J, R Shields, J Gaskin. 1978. Feline myeloproliferative disease. Changing manifestation in the peripheral blood. *Vet Pathol* 15, 437-448.
- Hisasue M, H Okayama, T Okayama, T Suzuki, T Mizuno, Y Fujino, K Naganobu, A Hasegawa, T Watari, N Matsuki, K Masuda, K Ohno, H Tsujimoto. 2001. Hematologic abnormalities and outcome of 16 cats with myelodysplastic syndromes. *J Vet Intern Med* 15, 471-477.
- Jain, N. 1970. A comparative cytochemical study of leukocytes of some animal species. *Folia Haematologica* 94, 49-63.
- Jain N, J Blue, C Grindem, J Harvey, G Kociba, J Krehbiel, K Latimer, R Raskin, M Thrall, J Zinki. 1991. Proposed criteria for classification of acute myeloid leukemia in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 20(3), 63-82.
- Jain N. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea and Febirger. Philadelphia, USA, pp. 307-348.
- Jarret W, L Anderson, O Jarret, H Laird, M Stewart. 1971. Myeloid leukaemia in a cat produced experimentally by feline leukaemia. *Virus Res Vet Sci* 12, 385-387.
- Lappin M. 1997. Viral diseases. En: Leib M., Monroe W. *Practical Small Animal Internal Medicine*. W.B. Saunders Philadelphia, USA, pp. 873-902.
- Levy J. 2000. FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. En: Ettinger S, Feldman, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5th ed. W.B. Saunders. Philadelphia, USA. v. 1.
- Lewis M, G Kociba, J Rojko, M Stiff, A Haberman, L Velicer, Olsen R. 1985. Retroviral-associated eosinophilic leukemia in the cat. *Am J Vet Res* 46(5), 1066-70.
- Murphy F, C Fauquet, D Bishop, S Ghabrial, A Jarvis, G Martelli, M Mayo, M Summers. 1995. *Virus taxonomy*. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag Wien, New York, USA, pp. 193-198.
- Muñoz L, M Valenzuela, G Villouta, C González. 2000. Desórdenes mieloproliferativos en tres gatos infectados con el virus leucemia felina. En: XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile. 25-27 Octubre. Universidad de Chile.
- Shimoda T, N Shiranaga, T Mashita, A Hasegawa. 2000. A hematological study on thirteen cats myelodysplastic syndrome. *J Vet Med Sci* 62(1), 59-64.
- Shelton G, M Linenberger. 1995. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Seminars Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 10 (4), 220-233.