



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE AGENTES DE TRANSMISSÃO VETORIAL EM GATOS COM LINFOMA E  
TUMORES MAMÁRIOS**

**Joana da Costa Cerqueira**

Coimbra, julho de 2022



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE AGENTES DE TRANSMISSÃO VETORIAL EM GATOS COM LINFOMA E  
TUMORES MAMÁRIOS**

**Coimbra, julho 2022**

**Joana da Costa Cerqueira**

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

**Constituição do Júri**

(Preencher conforme Edital)

*Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia Ferreira  
Anastácio*

*Arguente: Professor Doutor Joaquim José Garcia  
Henriques*

*Orientador: Professor Doutor Hugo Corte-Real Vilhena*

**Orientador**

Prof. Doutor Hugo Corte Real Vilhena

**Coorientadores**

Prof. Doutora Liliana Montezinho  
Prof. Doutora Patrícia Barradas (CESPU)

**Orientador Externo**

Dr.<sup>a</sup> Inês Santos  
(Hospital Veterinário de Aveiro)

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina  
Veterinária na EUVG

## Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador Professor Doutor Hugo Vilhena e à minha coorientadora Professora Doutora Liliana Montezinho, sem os quais esta dissertação não seria possível. Obrigada por toda a dedicação, apoio e disponibilidade em me ajudarem. Um obrigado também à Professora Doutora Patrícia Barradas e a toda a equipa do Laboratório de Microbiologia e Doenças Infeciosas do Instituto de Ciências Abel Salazar, assim como, ao Professor Doutor Paulo Pinheiro e ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra por toda ajuda prestada na parte laboratorial desta dissertação. Um obrigado muito especial à dona Sandra por toda a simpatia, ajuda e compreensão.

Agradeço também ao Hospital Veterinário de Aveiro por me terem dado a oportunidade de acompanhar toda a equipa, fazendo me sentir parte dela. Encontrei pessoas que me transmitiram imenso, tanto a nível profissional como pessoal. Foi sem dúvida uma das melhores decisões que tomei.

Ao meu grupo de amigos da faculdade que fizeram estes 6 anos passar a correr. Obrigada por todas as noitadas, por todas as gargalhadas e por todas as horas de estudo. Nunca me esquecerei das milhentas horas de Skype em que partilhamos o nosso dia-a-dia e criamos uma ligação maravilhosa.

Ao Francisco pela partilha diária de momentos e emoções que tornaram estes últimos anos um pouco melhores.

Ao Cerca e ao Ivan pelas horas intermináveis de boa conversa e por todas horas de estudo que nunca chegaram a ser muito más graças às “pausas para café”. Vocês foram e são um grande apoio na minha vida, obrigada por estarem sempre à distância de uma chamada.

À Margarida e à Letícia pela amizade maravilhosa que criamos. As saudades de viver com vocês são intermináveis, nunca me esquecerei das nossas “conversas da meia noite” assim como nunca me esquecerei de vocês.

À Renata por toda a amizade desde que nos lembramos de existir e por me ter dado o sentimento de casa numa nova cidade. À Rute por se fazer sentir perto mesmo estando fisicamente a quilómetros de distância. Há pessoas que estiveram mesmo desde sempre e são para sempre.

Aos meus amigos de Viana do Castelo e de Freixo por compreenderem sempre as minhas ausências físicas e por as terem transformado em saudades e horas de chamadas.

Aos meus pais, por terem acreditado nas minhas capacidades, apoiado sempre as minhas decisões e me darem todo o apoio em seguir o sonho. Vocês juntamente com o resto da nossa família são a minha bolha de apoio, de tranquilidade, de segurança e amor que me faz suportar qualquer desafio e nunca desesperar quando as coisas não correm tão bem porque o mais importante, que são vocês, estará lá sempre. “Queremos que trabalhes naquilo que te faz feliz” e assim será.

Àquele que é o meu melhor amigo e o exemplo da minha vida. A pessoa que me dá serenidade e esperança só com a presença e que me ensina todos os dias a viver. O meu Avô Zé, que me transmitiu a gratidão à vida e o fascínio pelos animais.

Coimbra teve encanto porque vocês estiveram lá!

## Índice Geral

Agradecimentos .....	iv
Índice de Tabelas .....	v
Índice de Figura .....	v
Lista de Abreviaturas .....	vi
Página de Título.....	1
Resumo .....	2
Palavras-Chave.....	2
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Keywords</i> .....	3
Introdução .....	4
Materiais e Métodos .....	6
Resultados .....	8
Discussão .....	13
Conclusão .....	14
Referências Bibliográficas .....	16

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Primers utilizados na amplificação dos diferentes agentes.....	7
Tabela 2 - Caracterização da população de felinos com linfoma.....	9
Tabela 3 - Caracterização da população de felinos com tumores mamários.....	10

## Índice de figuras

Figura 1- Padrão utilizado para identificação das bandas para os géneros <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> , <i>Babesia</i> e <i>Hepatozoon</i> .....	11
Figura 2- Imagem de eletroforese dos resultados da reação de PCR para os géneros <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> , <i>Babesia</i> e <i>Hepatozoon</i> .....	11
Figura 3- Padrão utilizado para identificação das bandas para os géneros <i>Leishmania</i> e <i>Mycoplasma</i> .....	12
Figura 4 - Imagem de eletroforese dos resultados da reação de PCR para o género <i>Leishmania</i> .....	12
Figura 5 - Imagem de eletroforese dos resultados da reação de PCR para o género <i>Mycoplasma</i> .....	12

## **Lista de Abreviaturas**

ADN – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EUA – Estados Unidos da América

FeLV– vírus da Leucemia Felina (do inglês *Feline leukemia vírus*)

FIV – vírus da Imunodeficiência Felina (do inglês *Feline immunodeficiency vírus*)

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction*)

TNM - Tumor, linfonodos, metástases (do inglês *Tumor, node, metastasis*)

°C – graus Celsius

## **Pesquisa de Agentes de Transmissão Vetorial em Gatos com Linfoma e Tumores Mamários**

Joana Cerqueira<sup>a</sup>, Liliana Montezinho<sup>b</sup>, Patricia Barradas<sup>c</sup>, Paulo Pinheiro<sup>d</sup> Hugo Vilhena<sup>b,,e,f,g</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (joanaccerqueira26@hotmail.com)

<sup>b</sup>Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([liliana.montezinho@euvg.pt](mailto:liliana.montezinho@euvg.pt); [hugo.vilhena@euvg.pt](mailto:hugo.vilhena@euvg.pt))

<sup>c</sup>Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU), Campus Universitário de Gandra, R. Central de Gandra 1317, Paredes, Portugal ([patricia.barradas@iucs.cespu.pt](mailto:patricia.barradas@iucs.cespu.pt)).

<sup>d</sup>Centro de Inovação em Biomedicina e Biotecnologia, Universidade de Coimbra, R. Larga 2, 3000-370 Coimbra, Portugal

<sup>e</sup>Centro de Investigação em Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, Apartado 1013, 5001-801, Vila Real, Portugal

<sup>f</sup>Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes, 197, 3020-210, Coimbra, Portugal

<sup>g</sup>Laboratório Associado de Ciência Animal e Veterinária – AL4Animals

## Resumo

O cancro é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em animais de companhia. Em felinos domésticos, as neoplasias do sistema hematopoiético são as que apresentam uma maior expressão, e destas, o linfoma é o que possui um maior número de casos reportados. As neoplasias mamárias são consideradas como o terceiro tipo de tumores mais frequente em gatos.

Vários estudos identificaram diferentes agentes infecciosos e parasitários como estando envolvidos na carcinogénese de diferentes tumores em oncologia humana e veterinária. No entanto, a informação relacionada com a função biológica dos agentes de transmissão vetorial na carcinogénese de tumores em felinos é escassa. Para além disso, a imunodepressão devida ao tumor e aos tratamentos oncológicos poderá permitir a multiplicação dos agentes infecciosos e originar a manifestação/agravamento de sinais clínicos associados a estes agentes, que poderão ser interpretados como sendo devidos aos tumores ou aos seus tratamentos.

Neste estudo, pretendemos avaliar a prevalência de agentes de transmissão vetorial dos géneros *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Mycoplasma* e *Leishmania* em felinos com linfomas e tumores mamários.

No presente estudo foram analisados 61 felinos, dos quais 31 animais diagnosticados com linfoma através de citologia e/ou histopatologia, e 30 gatos com diagnóstico histopatológico de tumor mamário, provenientes da região centro de Portugal. A presença de ADN dos agentes de transmissão vetorial no sangue total destes animais foi analisada através de PCR convencional.

Todos os felinos incluídos no estudo testaram negativo para os seis géneros testados. De acordo com os nossos resultados, a prevalência de agentes de transmissão vetorial na população de gatos com linfoma e tumores mamários estudada é baixa. Serão necessários outros estudos, com diferentes populações e com outros tumores, para confirmar os nossos resultados. No entanto, estes agentes deverão ser considerados em doentes oncológicos com sinais clínicos compatíveis com infeção por agentes de transmissão vetorial, principalmente considerando a imunodepressão associada à doença oncológica e aos seus tratamentos. Para além disso, os animais com doenças oncológicas e infetados por agentes de transmissão vetorial deverão ser estudados no sentido de avaliar a possível implicação destes agentes na carcinogénese de doenças oncológicas.

## Palavras chave

Agentes de transmissão vetorial, *Babesia* spp., *Ehrlichia/Anaplasma* spp., Felinos, *Hepatozoon* spp., Linfoma, *Leishmania* spp., *Mycoplasma* spp., Tumores mamários

## Abstract

Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality in companion animals. The neoplasias of the hematopoietic system are the most frequent tumors reported in domestic cats, and among these, lymphoma is the most common. Mammary tumors are considered to be third most frequent type of tumor in domestic felines.

Several studies have identified different infectious and parasitic agents as being involved in the carcinogenesis of different tumors in human and veterinary oncology. Nevertheless, the available information related to the biological role of vector-borne infections/diseases in feline carcinogenesis is scarce. Moreover, immunodepression associated with tumor and cancer treatments may allow the proliferation of infectious agents and lead to the manifestation/aggravation of clinical signs associated with these agents, which may be interpreted as being due to the tumors or their treatments.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of vector-borne agents of genera *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia/Anaplasma*, *Mycoplasma* and *Leishmania* in cats with lymphomas and mammary tumors.

In the present study, 61 cats from the central region of Portugal diagnosed with lymphoma (n=31) by cytology and/or histopathology and with histopathological diagnosis of mammary tumor (n=30) were analyzed. The presence of vector-borne agents DNA in the total blood of these animals was investigated by conventional PCR.

All felines included in the study tested negative for the six selected genera. According to these results, the prevalence of vector-borne agents amongst the analyzed feline population with lymphoma and mammary tumors is low. Further studies, with different populations and with other tumors are needed to confirm these results. However, these agents should be considered in oncology patients with clinical signs compatible with infections by vector-borne agents, especially considering the immunodepression associated with oncologic diseases and its treatments. Furthermore, animals with oncologic diseases infected with vector-borne agents should be further studied in order to evaluate the possible implications of these agents in tumor carcinogenesis.

## Keywords

*Babesia* spp., *Ehrlichia/Anaplasma* spp., Felines, *Hepatozoon* spp., Lymphoma, *Leishmania* spp., Mammary tumors, *Mycoplasma* spp., Vector-borne agents

## Introdução

O cancro é considerado como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em animais de companhia (Garden et al., 2018). Em felinos domésticos, as neoplasias do sistema hematopoiético são as que apresentam uma maior expressão, correspondendo aproximadamente a um terço de todos os seus tumores (Economu et al., 2021). Destas, o linfoma é a mais frequente, correspondendo a 50 a 90% das neoplasias hematopoiéticas (Economu et al., 2021; Vail & Pinkerton, 2020). As neoplasias mamárias são consideradas como o terceiro tipo mais frequente de tumores em gatos, constituindo cerca de 17% das neoplasias nesta espécie (Morris, 2013). Apesar de não existirem estatísticas específicas, a incidência destes tumores pode apresentar variações geográficas, dependendo do posicionamento da população em relação à castração precoce dos animais (Morris, 2013).

O linfoma (ou linfossarcoma) é uma neoplasia com origem nas células linforeticulares (Vail & Pinkerton, 2020). Apesar dos linfomas aparecerem mais associados aos tecidos linfóides, nomeadamente aos linfonodos, ao baço e à medula óssea, podem desenvolver-se em qualquer tecido do organismo onde exista tecido linfóide (Vail & Pinkerton, 2020). Apresenta uma maior prevalência em gatos jovens até aos quatro anos de idade e em gatos geriátricos a partir dos oito anos de idade (Gustafson et al., 2014). Os linfomas felinos podem apresentar várias localizações anatómicas, sendo classificados como alimentar, mediastínico ou torácico, nodal e extranodal (Novosad, 2003). A etiologia do linfoma felino é multifatorial, estando já bem definidos alguns fatores de risco, tal como a influência das infeções por retrovírus na sua oncogénese (Henry & Higginbotham, 2006). O vírus da leucemia felina (FeLV) foi, antes do uso generalizado de vacinas contra este vírus, a causa mais comum de tumores hematopoiéticos em gatos (Vail & Pinkerton, 2020). Antes da disponibilização da vacina, 60-70% dos casos diagnosticados com linfoma estavam associados à presença de virémia deste agente (Dobson & Lascelles, 2013); no entanto, diferentes estudos mais atuais realizados em diferentes regiões do mundo indicam uma diminuição da prevalência deste vírus em gatos com linfoma entre 0 a 21% (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020). Em contraste, em países como o Brasil, que têm uma elevada prevalência de infeção por FeLV na forma progressiva, a prevalência desta infeção em gatos com linfoma é de 56,6% (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020). No caso do vírus da imunodeficiência felina (FIV), este pode aumentar a incidência de linfoma em gatos, no entanto, parece ter um papel indireto na tumorigénese (Dobson & Lascelles, 2013; Vail & Pinkerton, 2020). No caso do linfoma gastrointestinal têm sido apontados como fatores de risco o tipo de dieta (Dobson & Lascelles, 2013), a inflamação crónica (Henry & Higginbotham, 2006; Vail & Pinkerton, 2020) e a infeção por *Helicobacter pylori* (Dobson & Lascelles, 2013; Vail & Pinkerton, 2020).

Aproximadamente 80% a 90% dos tumores mamários em gatas são malignos, e a sua maioria apresenta um comportamento agressivo e um prognóstico desfavorável (Vilhena et al., 2019). A etiologia dos tumores mamários em gatas é ainda pouco compreendida, no entanto, têm sido apontados alguns fatores de risco, nomeadamente a idade, raça, estado reprodutivo e exposição a estrogénios e progesterona endógenos e exógenos (Sorenmo et al., 2020).

Nos últimos anos, diferentes estudos em medicina humana e veterinária têm sugerido uma função potencial de agentes infecciosos tais como vírus, micoplasmas, bactérias e protozoários no processo de oncogênese de diversos tumores (Duncan et al., 2008; Lax & Thomas, 2002; Munday et al., 2017; Rogers, 2011; Schwing et al., 2019). Para além disso, de acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 13% dos cancros diagnosticados em humanos a nível mundial em 2018 foram atribuídos a agentes infecciosos carcinogénicos (de Martel et al., 2020; WHO, 2022). Destes agentes, os vírus são os que mais frequentemente são implicados na carcinogênese, e aqueles cujos mecanismos carcinogénicos são melhor conhecidos. Diversos estudos em medicina humana e veterinária descreveram a influência de diversos vírus na oncogênese de diferentes tumores, que ocorre geralmente através da integração de parte ou de todo o seu material genético no genoma da célula hospedeira (Hartmann, 2012; Williams et al., 2011). Em medicina veterinária, a atividade oncogénica do FeLV no desenvolvimento do linfoma felino é um dos exemplos mais estudados (Hartmann & Hofmann-Lehmann, 2020).

No entanto, tanto em medicina humana como em medicina veterinária, outros agentes infecciosos ( para além dos vírus) e parasitários têm sido implicados na oncogênese tumoral, e mecanismos como a promoção de inflamação crónica, mecanismos genéticos e a modulação do sistema imunitário têm sido sugeridos como responsáveis pela ação destes agentes na tumorigénese (Duncan et al., 2008; Henriques et al., 2021; Schwing et al., 2019).

As doenças de transmissão vetorial designam doenças causadas por parasitas, vírus e bactérias que são transmitidos por vetores artrópodes (Maia et al., 2014). A prevalência de infeções / doenças por agentes transmitidos por vetores está a aumentar a nível global em humanos e em animais, em parte devido às alterações climáticas que têm um impacto direto na abundância e distribuição de vetores artrópodes, mas também devido à maior mobilidade de humanos e animais, que promovem também a circulação e troca vetores e agentes infecciosos (Do et al., 2021; Maia & Cardoso, 2015; Vilhena et al., 2013). Diversos estudos em oncologia humana e oncologia veterinária canina têm pesquisado a influência de agentes de transmissão vetorial na carcinogênese (Duncan et al., 2008; Henriques et al., 2021). No entanto, informação similar em gatos é muito escassa.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência molecular de doenças infecciosas e parasitárias de transmissão vetorial em felinos domésticos com doenças tumorais – linfomas e tumores mamários malignos, testando os géneros *Anaplasma/Ehrlichia*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Mycoplasma* e *Leishmania*, de forma a contribuir para o estudo da função biológica potencial destes agentes na carcinogênese destes tumores.

## **Materiais e Métodos**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), Parecer 10/2022.

### **Amostra**

Para este estudo foram selecionados gatos com diagnóstico de linfoma e gatas com adenocarcinomas mamários que foram apresentados no Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC) e no Hospital Veterinário do Baixo Vouga (HVBV) entre 2014 e 2022, e dos quais existiam amostras biológicas (sangue total em tubos com EDTA conservado a -20°C) armazenadas. As amostras biológicas dos animais incluídos neste estudo foram colhidas no âmbito de outros projetos de investigação (Figueira et al., 2015; Vilhena et al., 2019; Vitorino et al., 2021).

Em todos os animais doentes incluídos no estudo com diagnóstico de linfoma foi realizado um exame de estado geral, hematologia, perfil bioquímico sanguíneo, avaliação dos linfonodos, radiologia torácica e ultrassonografia abdominal, para avaliação do estado de saúde e para estadiamento clínico. Os dados referentes à identificação e os parâmetros clínicos avaliados incluíram a raça, peso, género, estado reprodutivo (castrado ou não castrado), idade, estado de infeção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou FeLV, localização anatómica do tumor (mediastínico, alimentar, nodal ou extranodal), grau histológico (alto ou baixo grau) e o estadiamento clínico (I a V). O estadiamento clínico foi determinado com base no Sistema de Estadiamento Clínico de Linfoma em Animais de Companhia da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Vail & Pinkerton, 2020).

Nos animais com diagnóstico de carcinoma mamário foi realizado um exame de estado geral, hematologia, perfil bioquímico sanguíneo, avaliação dos linfonodos, radiologia torácica e ultrassonografia abdominal para avaliação do estado de saúde e estadiamento clínico. Os dados referentes à identificação e os parâmetros clínicos avaliados incluíram a raça, género, estado reprodutivo (castrado ou não castrado) e as características clínicas e histopatológicas do tumor como o tipo histológico (determinado de acordo com a classificação da OMS) (Misdorp et al., 1977) e o grau histológico (determinado de acordo com a classificação de Elston e Ellis, 2002). O estadiamento TNM foi determinado em todas as gatas de acordo com o sistema de estadiamento clínico da OMS modificado (McNeill et al., 2009).

### **Isolamento do ADN e amplificação por PCR convencional**

O ADN total foi extraído de cada amostra de sangue total armazenado em tubos com EDTA, usando um kit comercial (QIAamp® DNA Mini kit), de acordo com as instruções do fabricante. O ADN eluído foi mantido a -20 °C até ao ensaio de PCR. Para a determinação da infeção por *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. foi utilizado o PCR convencional. No caso da *Babesia* spp. foram utilizados os *primers* PIRO-A e PIRO-B para amplificação do fragmento 408-bp do gene 18S rRNA (Olmeda et al., 1997). Para os géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* foram utilizados os

*primers* EHR16SD e EHR16SR para amplificação do fragmento 345-bp do gene 16S rRNA (Gal et al., 2008) e para o *Hepatozoon* spp. foram utilizados os *primers* HEP-F e HEP-R para amplificação do fragmento 666-bp do gene 18S rRNA (Inokuma et al., 2002). Para a detecção de *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Hepatozoon* nas reações de PCR foi utilizada a GoTaq®G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Na detecção de ADN de *Mycoplasma* spp. as amostras foram processadas usando um protocolo de PCR convencional descrito por Jensen et al. (2001) com base na amplificação do fragmento 193 bp e 170 bp do gene 16S rRNA (Kamrani et al., 2008). Para a detecção de ADN de *Leishmania* spp. foram utilizados os *primers* RV1-RV2 para amplificação do fragmento 145 bp segundo o protocolo de PCR convencional descrito por Lachaud et al. (2002). Nas reações de PCR para *Mycoplasma* spp. e *Leishmania* spp. foi utilizada a NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente as amostras foram processadas em grupos de 10 animais, sendo posteriormente os grupos com resultados positivos suspeitos ou com resultados positivos claros desdobrados para se identificar o(s) animal(ais) positivo(s) para aquele agente. As amostras positivas na técnica de PCR seriam submetidas a técnica de sequenciação, para confirmação do resultado e identificação do agente. Em todas as reações foram também utilizados controlos negativos, obtidos através da substituição do volume do ADN a adicionar em cada reação, por um volume igual de água estéril.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na amplificação dos diferentes agentes.

<b>Género testado</b>	<b>Nomes dos <i>primers</i></b>	<b>Tamanho do produto (bp)</b>	<b><i>Primers</i> do PCR (5' - 3')</b>
<b><i>Babesia</i></b>	PIRO-A e PIRO-B	408	5' - AATACCCAATCCTGACACAGGG-3' 5' - TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'
<b><i>Ehrlichia/ Anaplasma</i></b>	EHR16SD e EHR16SR	345	5' -GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' 5' -TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'
<b><i>Hepatozoon</i></b>	HEP-F e HEP-R	666	5' -ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3' 5' -CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3'
<b><i>Mycoplasma</i></b>		170/193	5' -ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3' 5' -ACGCCAATAAATCCGRATAAT-3'
		138	5' -AGAGGCGAAGGCGAAAAC-3' 5' -CTACAACGCCGAAACACAAA-3'
<b><i>Leishmania</i></b>	RV1 e RV2	145	5' -CTTTTCTGGTCCCGGGTAGG-3' 5' -CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'

## **Resultados**

Este estudo incluiu 61 felinos, dos quais 31 animais diagnosticados com linfoma através de citologia e / ou histopatologia, e 30 gatos com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário. A população incluída no estudo encontra-se caracterizada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 2 - Caracterização da população de felinos com linfoma.

<b>Gatos com Linfoma (n=31)</b>	
<b>Raça</b>	
Europeu Comum	30
Persa	1
<b>Género</b>	
Macho	18
Fêmea	13
<b>Estado Reprodutivo</b>	
Castrado	22
Não Castrado	9
<b>Idade (anos)</b>	
Média (desvio padrão)	7,1 ( ± 5,1)
Mínimo - Máximo	0,6-17
<b>Peso (Kg)</b>	
Média (desvio padrão)	4,1 ( ± 1,2)
Mínimo - Máximo	2,3 – 6,7
<b>Infeção por FIV / FeLV</b>	
FeLV +	11
FIV +	3
FIV e FeLV -	6
Não determinado	11
<b>Localização Anatômica</b>	
Mediastínico	16
Alimentar	5
Nodal	1
Extranodal	5
Duas localizações	4
<b>Grau Histológico</b>	
Alto grau	29
Baixo Grau	2
<b>Estadio Clínico<sup>#</sup></b>	
Estadio I	14
Estadio II	11
Estadio III	3
Estadio IV	1
Estadio V	0

# A determinação do estadio clínico não foi determinada nos animais com linfoma de baixo grau;

Tabela 3 - Caracterização da população de felinos com tumores mamários.

<b>Gatas com Tumores mamários (n=30)</b>	
<b>Raça</b>	
Europeu Comum	28
Persa	1
Siamês	1
<b>Estado Reprodutivo</b>	
Castrado	14
Não Castrado	16
<b>Idade (anos)</b>	
Média (desvio padrão)	11,8 ( ± 3,2)
Mínimo - Máximo	6 - 19
<b>Peso (Kg)</b>	
Média (desvio padrão)	4,0 ( ± 0,9)
Mínimo - Máximo	2,5 – 6,6
<b>Tipo histológico<sup>#</sup></b>	
Carcinoma tubulopapilar	16
Carcinoma sólido	8
Carcinoma cribriforme	1
Carcinoma mucinoso	1
<b>Grau Histológico<sup>#1</sup></b>	
Grau I	3
Grau II	9
Grau III	12
<b>Estadio Clínico<sup>#2</sup></b>	
Estadio I	6
Estadio II	6
Estadio III	9
Estadio IV	5

# Em quatro das gatas com carcinoma mamário não foi possível obter informações sobre o tipo histológico.

#1 Em seis gatas não foi possível obter informação sobre o grau histológico

#2 Em quatro gatas não foi possível obter informação sobre o estadio clínico.

Numa primeira fase em que as amostras foram analisadas em grupos de 10 animais obtivemos resultados negativos para os géneros *Anaplasma/Ehrlichia* e *Hepatozoon*, uma vez que não havia presença de bandas nas zonas de 345 bp e 666 bp respectivamente como se pode verificar na Figura 2. No caso do género *Babesia*, a presença de bandas na zona de 408 bp levantaram algumas dúvidas da presença de ADN deste género em algumas amostras (Figura-2), sendo os grupos suspeitos desdobrados posteriormente onde se verificou que todas as amostras eram negativas.

Para o género *Leishmania*, apesar da contaminação observada, a presença de algumas bandas na zona de 145 bp levantaram algumas dúvidas (Figura-4) sendo os grupos suspeitos também desdobrados posteriormente, verificando-se à semelhança dos géneros anteriores que as amostras eram negativas. Em relação ao género *Mycoplasma*, na análise feita em grupos pode-se observar que todos os grupos eram negativos para este agente, uma vez que, não se observaram bandas na zona de 170/193 bp (Figura-5).

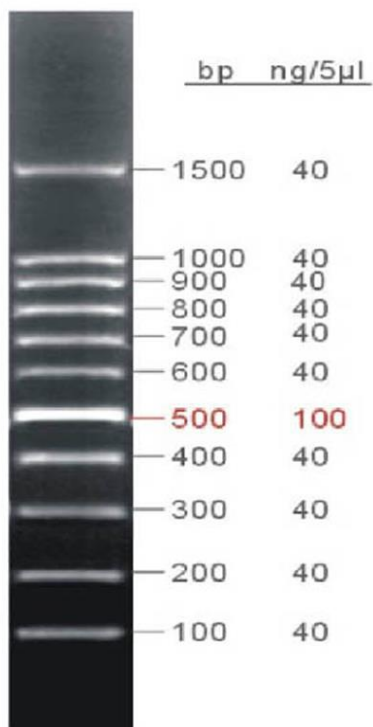


Figura 1- Padrão utilizado para identificação das bandas para os géneros *Anaplasma/Ehrlichia*, *Babesia* e *Hepatozoon*.

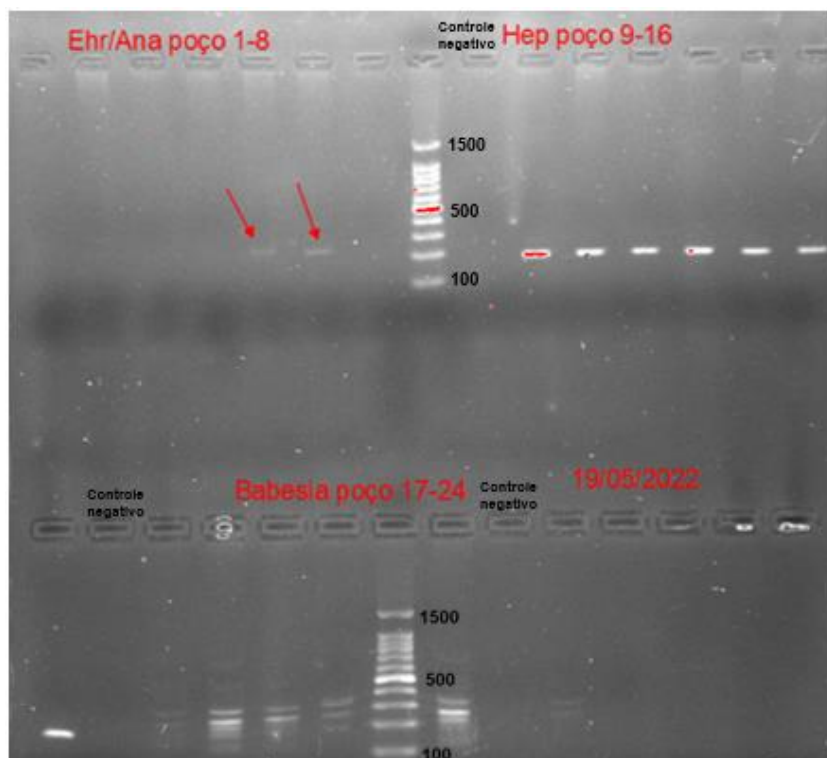


Figura 2- Imagem da eletroforese em gel de agarose a 3% demonstrando os resultados da reação de PCR para os géneros *Anaplasma/Ehrlichia*, *Babesia* e *Hepatozoon*.

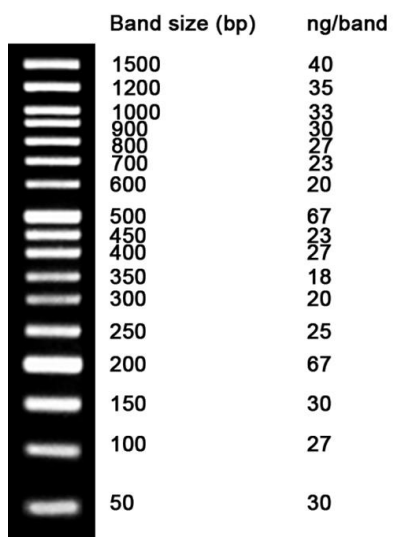


Figura 3- Padrão utilizado para identificação das bandas. Para os gêneros *Leishmania* e *Mycoplasma*.

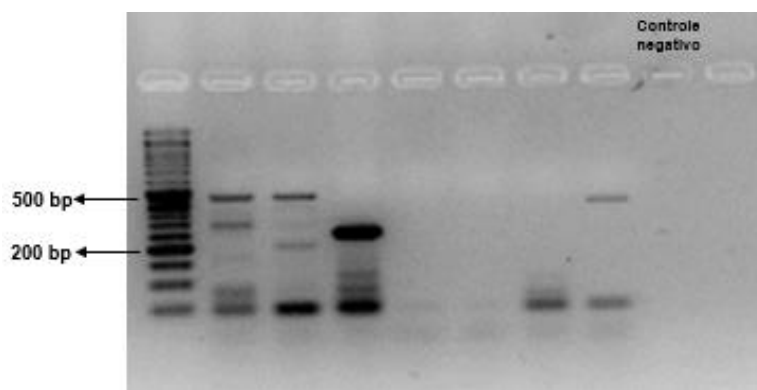


Figura 4- Imagem da eletroforese em gel de agarose a 3% demonstrando os resultados reação de PCR para o gênero *Leishmania*.

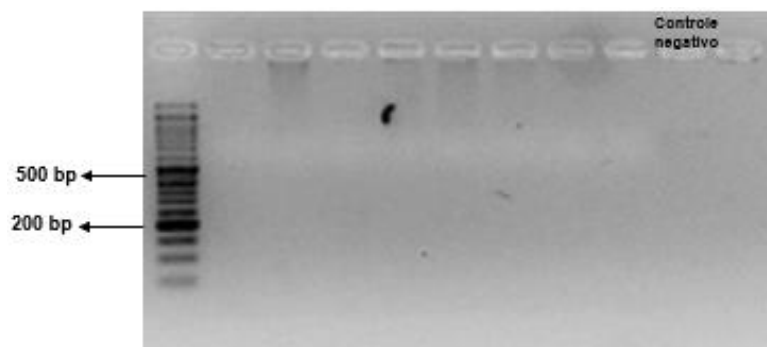


Figura 5- Imagem da eletroforese em gel de agarose a 3% demonstrando os resultados da reação de PCR para o gênero *Mycoplasma*.

## Discussão

Tal como descrito anteriormente, diferentes estudos em medicina humana e veterinária sugerem que diferentes agentes infecciosos e parasitários poderão estar envolvidos na carcinogénese de diferentes tumores (Duncan et al., 2008; Henriques et al., 2021; Schwing et al., 2019). Para além disso, vários estudos desenvolvidos nas últimas décadas mostram que a prevalência de infeção/doença por agentes de transmissão vetorial tem aumentado a nível global, tanto em humanos como em animais (Beugnet & Marié, 2009; Maggi & Krämer, 2019; Paris & Neumayr, 2018; Parola et al., 2013). Por esse motivo, diferentes estudos em oncologia humana e veterinária têm avaliado a ação biológica potencial destes agentes na tumorigénese de diferentes neoplasias, através de mecanismos como a promoção de inflamação crónica, alterações genéticas e a modulação do sistema imunitário a serem sugeridos como responsáveis pela ação destes agentes na carcinogénese (Duncan et al., 2008; Henriques et al., 2021; Schwing et al., 2019). Como exemplos, o envolvimento de agentes do género *Leishmania* na oncogénese tem sido sugerido em diferentes tumores em oncologia humana e veterinária, incluindo em diferentes formas de linfoma, leucemias, mieloma múltiplo, osteossarcoma, carcinomas, sarcomas e tumor venéreo transmissível (Ferro et al., 2013; Schwing et al., 2019) e em medicina veterinária, infeção por *Spirocerca lupi* e a formação de sarcomas em cães (Rojas et al., 2020). O nódulo esofágico formado durante a infeção progride de uma lesão inflamatória fibroquística para um nódulo pré-neoplásico, caracterizado pela presença de fibroblastos ativos que podem sofrer transformação neoplásica e originar sarcomas (Rojas et al., 2020). Aproximadamente 25% dos nódulos esofágicos sofrem transformação neoplásica, com desenvolvimento de metástases para outros órgãos (Rojas et al., 2020). As infeções/doenças por agentes de transmissão vetorial são reportadas com menor frequência em gatos do que em cães. Apesar disso, diferentes estudos realizados em todo o mundo têm mostrado que a prevalência de infeção destes agentes é, em alguns casos, elevada (Ayllón et al., 2012; Diakou et al., 2017; Morganti et al., 2019), e que estas poderão ser subdiagnosticadas devido à existência de uma percentagem elevada de casos assintomáticos, ou de nos casos de infeções sintomáticas, os sinais clínicos serem inespecíficos (Maia et al., 2014; Vilhena et al., 2013, 2019). Apesar disso, a ação biológica potencial das infeções por agentes de transmissão vetorial na tumorigénese felina é escassa.

Este estudo teve como objetivo identificar infeção por agentes de transmissão vetorial de seis géneros diferentes - *Anaplasma/Ehrlichia*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Mycoplasma* e *Leishmania*, em gatos com linfoma e tumores mamários de Portugal. Para tal foi utilizada a técnica de PCR, que é o método que apresenta maior sensibilidade e especificidade na deteção destes agentes (Barker, 2019). Nenhum dos gatos incluídos no estudo testou positivo para nenhum dos agentes de transmissão vetorial pesquisados.

A baixa prevalência de casos positivos para os géneros *Anaplasma/Ehrlichia* era esperada, uma vez que as infeções por estes agentes em gatos são raras e esporadicamente documentadas em todo o mundo (Álvarez-Fernández et al., 2022), e os últimos dados portugueses indicam uma baixa prevalência (Maia et al., 2014; Vilhena et al., 2013). No entanto, no caso do género *Hepatozoon* spp. a inexistência de casos positivos contraria outros estudos realizados em Portugal que apontam para uma

prevalência de 8,6-15,6% (Vilhena et al., 2013; Maia et al., 2014). Ainda assim, estes valores são semelhantes aos dados recentes referentes à região da Catalunha (Álvarez-Fernández et al., 2022) e ao norte de Itália (Ebani et al., 2020), em que não foram encontrados resultados positivos para agentes deste género. Tal como os dois agentes anteriormente mencionados, também não foi detetada a presença de *Babesia* spp., no entanto, as infeções por estes protozoários em gatos parecem ser raras, não sendo detetados nos últimos estudos realizados em Espanha (Álvarez-Fernández et al., 2022) e Itália (Ebani et al., 2020). Os últimos dados referentes a Portugal indicavam uma prevalência moderada deste agente (6,6-9,4%) em comparação com outros países (Vilhena et al., 2013; Maia et al., 2014), o que não se verificou no presente estudo. No caso do género *Leishmania* a inexistência de resultado positivos neste estudo é concordante com os últimos dados referentes ao Norte de Portugal que indicaram uma prevalência baixa, nomeadamente 0,3% (Vilhena et al., 2013), no entanto, estudos europeus revelam resultados ligeiramente mais expressivos com valores de 5,6% em Espanha (Alcover et al., 2021) e 5,5% em Itália (Dedola et al., 2018).

Os hemoplasmas hemotrópicos felinos (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*) são descritos como amplamente distribuídos e prevalentes a nível mundial, sendo Portugal um dos países com uma taxa de infeção elevada (Álvarez-Fernández et al., 2022). Dois estudos realizados em Portugal mostraram uma prevalência molecular de 27,1% em gatos da região sul (Duarte et al., 2015), e uma prevalência molecular de 43,4% em gatos das zonas norte e centro (Martínez-Díaz et al., 2013).

As diferenças na prevalência de infeção por agentes de transmissão vetorial reportados nos estudos apresentados atrás e no presente estudo podem ser explicadas por diferentes fatores, tais como as variações nos métodos laboratoriais utilizados e as variações microclimáticas dentro da mesma área (Qurollo, 2019). No entanto, o habitat, o estilo de vida (maioritariamente *indoor*) e os cuidados de saúde prestados (nomeadamente em termos de desparasitação externa) aos gatos que integram esta amostra, ao tornar o contacto com os vetores destes agentes pouco provável, são provavelmente os mais importantes para justificar a baixa prevalência de infeção encontrada.

Sendo este um trabalho em desenvolvimento, a ausência de pesquisa destes agentes em amostras sanguíneas de animais infetados por estes agentes (controlos positivos) e de controlos internos de amplificação de ADN que validem a técnica de PCR assim como a sua otimização são fatores limitantes desta investigação. Sendo este um trabalho em desenvolvimento, esses métodos serão realizados posteriormente, e servirão para a validação dos resultados obtidos neste estudo

## **Conclusão**

De acordo com os nossos resultados, a prevalência de agentes de transmissão vetorial na população de gatos com linfoma e tumores mamários estudada é baixa, uma vez que todos os animais incluídos no estudo testaram negativo para os seis géneros de agentes de transmissão vetorial testados. Por esse motivo, este estudo não contribuiu para o estudo da função biológica que as infeções

por agentes de transmissão vetorial poderão ter na tumorigênese do linfoma felino e do carcinoma mamário felino. Serão necessários outros estudos, com diferentes populações de gatos com linfomas, tumores de mama e com outros tumores, para confirmar os nossos resultados. No entanto, estes agentes deverão ser considerados em doentes oncológicos com sinais clínicos compatíveis com infecção por agentes de transmissão vetorial, principalmente considerando a imunodepressão associada à doença oncológica e aos seus tratamentos. Para além disso, os animais com doenças oncológicas e infetados por agentes de transmissão vetorial deverão ser estudados no sentido de avaliar a possível implicação biológica destes agentes na carcinogênese das doenças oncológicas.

## Referências Bibliográficas

- Alcover, M. M., Basurco, A., Fernandez, A., Riera, C., Fisa, R., Gonzalez, A., Verde, M., Garrido, A. M., Ruíz, H., Yzuel, A., & Villanueva-Saz, S. (2021). A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. *Parasites and Vectors*, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04682-w>
- Álvarez-Fernández, A., Maggi, R., Martín-Valls, G. E., Baxarias, M., Breitschwerdt, E. B., & Solano-Gallego, L. (2022). Prospective serological and molecular cross-sectional study focusing on *Bartonella* and other blood-borne organisms in cats from Catalonia (Spain). *Parasites and Vectors*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05105-6>
- Ayllón, T., Diniz, P. P. V. P., Breitschwerdt, E. B., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F., & Sainz, A. (2012). Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *12*(2), 143–150. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0729>
- Barker, E. N. (2019). Update on Feline Hemoplasmosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *49*(4), 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.009>
- Beugnet, F., & Marié, J. Lou. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*, *163*(4), 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.028>
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, *8*(2), e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
- Dedola, C., Zobba, R., Varcasia, A., Visco, S., Alberti, A., Pipia, A. P., Scala, A., & Pinna Parpaglia, M. L. (2018). Serological and molecular detection of *Leishmania infantum* in cats of Northern Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *13*(September 2017), 120–123. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.05.003>
- Diakou, A., Di Cesare, A., Accettura, P. M., Barros, L., Iorio, R., Paoletti, B., Frangipane di Regalbono, A., Halos, L., Beugnet, F., & Traversa, D. (2017). Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005335>
- Do, T., Kamyngkird, K., Chimnoi, W., & Inpankaew, T. (2021). Evaluation of hematological alteration of vector-borne pathogens in cats from Bangkok, Thailand. *BMC Veterinary Research*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02737-1>
- Dobson, J. M., & Lascelles, B. D. X. (2013). Canine and Feline Oncology - BSAVA. *British Small Animal Veterinary Association*, *53*(9), 1689–1699.
- Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H. D., Neto, I., Bráz, B. S., Rodrigues, C., Martins, T., Rosado, R., Ferreira, J. P., Santos-Reis, M., & Tavares, L. (2015). Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *17*(6), 516–522. <https://doi.org/10.1177/1098612X14550172>

- Duncan, A. W., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Maggi, R. G., Williams, L. E., & Correa, M. T., & Breitschwerdt, E. B. (2008). *Bartonella DNA in the Blood and Lymph Nodes of Golden Retrievers with Lymphoma and in Healthy Controls*. 89–95.
- Ebani, V. V., Guardone, L., Marra, F., Altomonte, I., Nardoni, S., & Mancianti, F. (2020). Arthropod-borne pathogens in stray cats from northern Italy: A serological and molecular survey. *Animals*, *10*(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ani10122334>
- Economu, L., Stell, A., O'Neill, D. G., Schofield, I., Stevens, K., & Brodbelt, D. (2021). Incidence and risk factors for feline lymphoma in UK primary-care practice. *Journal of Small Animal Practice*, *62*(2), 97–106. <https://doi.org/10.1111/jsap.13266>
- Ferro, S., Palmieri, C., Cavicchioli, L., Zan, G. De, Aresu, L., & Benali, S. L. (2013). Leishmania Amastigotes in Neoplastic Cells of 3 Nonhistiocytic Canine Tumors. *Veterinary Pathology*, *50*(5), 749–752. <https://doi.org/10.1177/0300985813480192>
- Figueira, A. C., Gomes, C., Vilhena, H., Miranda, S., Carvalheira, J., DE Matos, A. J., Dias-Pereira, P., & Gärtner, F. (2015). Characterization of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and p120-Catenin Expression in Feline Mammary Tissues and their Relation with E- and P-Cadherin. *Anticancer Research*, *35* (6), 3361–3369.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2008). Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Journal*, *175*(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.013>
- Garden, O. A., Volk, S. W., Mason, N. J., & Perry, J. A. (2018). Companion animals in comparative oncology: One Medicine in action. *Veterinary Journal*, *240*, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.08.008>
- Gustafson, T. L., Villamil, A., Taylor, B. E., & Flory, A. (2014). A retrospective study of feline gastric lymphoma in 16 chemotherapy-treated cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, *50*(1), 46–52. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5989>
- Hartmann, K. (2012). Clinical aspects of feline retroviruses: A review. *Viruses*, *4*(11), 2684–2710. <https://doi.org/10.3390/v4112684>
- Hartmann, K., & Hofmann-Lehmann, R. (2020). What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *50*(5), 1013–1036. <https://doi.org/10.1016/j.cvs.2020.05.006>
- Henriques, J., Felisberto, R., Almeida, B., Ramos, J., Constantino-Casas, F., Dobson, J., Matos, R., Santos, A., de Sousa, R., & Alves, M. (2021). Canine lymphoma and vector-borne diseases: Molecular and serological evaluation of a possible complicity. *Veterinary and Comparative Oncology*, *19*(1), 183–190. <https://doi.org/10.1111/vco.12658>
- Henry, C., & Higginbotham, M. (2006). *Cancer Management in Small Animal Practice*.
- Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., & Onishi, T. (2002). Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, *106*(3), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00065-1)
- Kamrani, A., Parreira, V. R., Greenwood, J., & Prescott, J. F. (2008). The prevalence of Bartonella,

- hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(5), 411–419.
- Lax, A. J., & Thomas, W. (2002). How bacteria could cause cancer: One step at a time. *Trends in Microbiology*, 10(6), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02360-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02360-0)
- Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–37. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Maia, C., & Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, 213(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, Â., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M. L., Cardoso, L., & Campino, L. (2014). Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-115>
- Martínez-Díaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., & Altet, L. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(10), 879–885. <https://doi.org/10.1177/1098612X13480985>
- McNeill, C. J., Sorenmo, K. U., Shofer, F. S., Gibeon, L., Durham, A. C., Barber, L. G., Baez, J. L., & Overley, B. (2009). Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(1), 123–129. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0244.x>
- Misdorp, W., Else, R., Hellmén, E., Lipscomb, & TP. (1977). *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat In: World Health Organization, ed. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*. Second ser. Vol 7. Washington. DC USA, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology;1999:11-56.
- Morganti, G., Veronesi, F., Stefanetti, V., Di Muccio, T., Fiorentino, E., Diaferia, M., Santoro, A., Passamonti, F., & Gramiccia, M. (2019). Emerging feline vector-borne pathogens in Italy. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3409-8>
- Morris, J. (2013). Mammary Tumours in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(5), 391–400. <https://doi.org/10.1177/1098612X13483237>
- Munday, J. S., Thomson, N. A., & Luff, J. A. (2017). Papillomaviruses in dogs and cats. *Veterinary Journal*, 225(2010), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.018>
- Novosad, C. A. (2003). Principles of treatment for VASs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 115–117.
- Olmeda, A. S., Armstrong, P. M., Rosenthal, B. M., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., Miguez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J. A., Spielman, A., & Telford, S. R. (1997). Short report: A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, 67(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00045-4)
- Paris, D. H., & Neumayr, A. (2018). Ticks and tick-borne infections in Asia: Implications for travellers.

- Travel Medicine and Infectious Disease*, 26, 3–4. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.11.009>
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Quorllo, B. (2019). Feline Vector-Borne Diseases in North America. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 49(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.012>
- Rogers, M. B. (2011). Mycoplasma and cancer: In search of the link. *Oncotarget*, 2(4), 271–273. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.264>
- Rojas, A., Dvir, E., & Baneth, G. (2020). Insights on *Spirocerca lupi*, the Carcinogenic Dog Nematode. *Trends in Parasitology*, 36(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.004>
- Schwing, A., Pomares, C., Majoor, A., Boyer, L., Marty, P., & Michel, G. (2019). Leishmania infection: Misdiagnosis as cancer and tumor-promoting potential. *Acta Tropica*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.010>
- Sorenmo, K., Worley, D., & Zappuli, V. (2020). Tumors of the Mammary Gland. In *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (p. 604).
- Vail, D., & Pinkerton, M. (2020). Hematopoietic Tumors. In *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (sixth edit, p. 688). Elsevier.
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, V. L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., & Silvestre-Ferreira, A. C. (2013). *Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal*. [www.ncbi](http://www.ncbi).
- Vilhena, H., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J. J., Figueira, A. C., Miranda, S., Ribeiro, A., Canadas, A., Dias-Pereira, P., Rubio, C. P., Franco, L., Tecles, F., Cabeças, R., Pastor, J., & Silvestre-Ferreira, A. C. (2019). Acute phase proteins and biomarkers of oxidative status in feline spontaneous malignant mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 17(3), 394–406. <https://doi.org/10.1111/vco.12486>
- Vitorino, C., Figueira, A.C. Tvarijonaviciute, A., Almeida, A., Montezinh, L., Silvestre-Ferreira, A.C. Almeida, M., Montenegro, L., Escribano, D., & Vilhena, H. (2021). Warburg effect in feline lymphoma. *Abstracts of the European Society of Veterinary Oncology Annual Congress. Vet Comp Oncol*, 2021:19:4-24. <https://doi.org/10.1111/vco.12764>
- WHO. (2022). *Cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>
- Williams, V. M., Filippova, M., Soto, U., & Duerksen-Hughes, P. J. (2011). HPV-DNA integration and carcinogenesis: Putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virology*, 6(1), 45–57. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>