

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PERITONITE INFECCIOSA FELINA: CORRELAÇÃO ENTRE FORMAS CLÍNICAS E A
DETEÇÃO DE MUTAÇÕES VIRAIS

INÊS ANDREIA PINHEIRO BASTOS

ORIENTADOR(A):
Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil Neves

TUTOR(A):
Doutor Cláudio Rodrigues da Silva
Lobo de Macedo Cabral

2022

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PERITONITE INFECIOSA FELINA: CORRELAÇÃO ENTRE FORMAS
CLÍNICAS E A DETEÇÃO DE MUTAÇÕES VIRAIS

INÊS ANDREIA PINHEIRO BASTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

VOGAIS:

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil
Neves

ORIENTADOR(A):

Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil Neves

TUTOR(A):

Doutor Cláudio Rodrigues da Silva Lobo
de Macedo Cabral

2022

Declaração Relativa às Condições de Reprodução da Dissertação

Nome: Inês Andreia Pinheiro Bastos

Título da Tese ou Dissertação: Peritonite Infeciosa Felina: Correlação entre Formas Clínicas e a deteção de Mutações Virais

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2022

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 27 de abril de 2022

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

Inês Andreia Pinheiro Bastos

Agradecimentos

A presente dissertação é o culminar do percurso iniciado em 2015, momento em que pela primeira vez atravessei o portão da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa como nova aluna desta *mui* nobre instituição. Agora, como há seis anos atrás, volto a sentir este sentimento de alegria e conquista por poder finalmente exercer a profissão com que sempre sonhei, a qual espero nunca desapontar.

Dito isto, não podia deixar de começar por agradecer à minha família que me ensinou que os sonhos, com muito trabalho e dedicação, realmente se concretizam. À minha mãe, que é uma “mãe leoa”, que sempre me ensinou a importância do trabalho e dedicação para alcançar os meus objetivos e de quem herdei a força para continuar nos momentos mais complicados. Ao meu pai, o meu apoio incondicional, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu própria não o fiz, e a quem fui buscar a leveza e amparo quando tudo parecia impossível de conseguir. À Sofia, que é mais que minha “irmã”, que sempre esteve lá desde as primeiras memórias e que é a minha companheira de todas as horas. Por último, à minha avó, a quem dedico esta dissertação e todo o meu trabalho futuro e a quem quero deixar este último miminho por ver este “nosso” sonho cumprido. Obrigada por todo o carinho e paciência nas horas e horas de choro, por vezes partilhado, pré-época de exames. Obrigada pela segurança e confiança que sempre demonstraste e continuas a demonstrar em mim. Muito, muito obrigada a esta minha “segunda mãe com açúcar” por estar presente, agora e sempre, e por ser uma força da natureza.

Gostaria de agradecer à equipa da Unidade de Isolamento e Contenção Biológica por me ter acolhido de braços abertos. Gostava de destacar duas pessoas que foram uma surpresa no decorrer deste estágio e que me ajudaram muito ao longo deste percurso, o meu colega de estágio Miguel Maximino e a enfermeira Sofia Caldeira.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Solange Gil por ter-me aceite como sua orientanda e pela calma que me transmitiu nos momentos de maior incerteza, decorrentes desta pesquisa. Muito obrigada por toda a sua simpatia, cuidado e conhecimento transmitido, foi um prazer poder trabalhar consigo tanto a nível profissional, como pessoal.

À Dra. Inês Machado, por toda a ajuda referente à colheita e organização de dados, por toda a oportunidade, disponibilidade e conhecimento transmitido durante o estágio curricular e por fazer sempre questão de nos fazer sentir incluídos e, verdadeiramente, parte da equipa.

A toda a equipa do Centro Veterinário Ponto Vet, muito obrigada por me terem aceite como estagiária. Um especial agradecimento à Dra. Catarina Silva e ao Dr. Cláudio Cabral

por todo o conhecimento transmitido, dedicação e amizade. Obrigada por me motivarem a ser melhor veterinária todos os dias e por me mostrarem o quão bonita e gratificante esta profissão realmente pode ser.

Quero agradecer aos presentes que a faculdade me deu, que não foram poucos por sinal. Patrícia, Daniel, Sarah, Joana, aos meus afilhados, Sara, Marta, Melissa e João, e “netos”, Bernardo e Joana, um muito obrigada por tomarem esta passagem pela faculdade uma memória inesquecível e por serem a família que eu escolhi para me acompanhar nesta e em todas as outras etapas que estão por vir. À minha madrinha Inês, um enorme obrigada por me trazer sempre à razão, evitar dramas desnecessários e estar sempre lá para dar apoio incondicional.

À minha madrinha Joana, obrigada por me teres acolhido como mais ninguém, obrigada pela pessoa que és, todo o suporte e força que me deste e por continuares a fazer parte do meu percurso sempre.

Um obrigado muito especial a ti, Andreia, que és muito mais que minha amiga. Obrigada por todo o colo e acolhimento que sempre me deste, obrigada por todo o choro partilhado, por todas as horas de telefonemas e estudo. Obrigada pelas gargalhadas noite dentro e pelos melhores sobrinhos de quatro patas que alguém pode pedir. Obrigada por me inspirares a ser melhor a nível profissional e pessoal todos os dias, e por nunca me deixares cair. No fundo, obrigada por fazeres parte do mim e me permitires ser família.

À minha Márcia, que é a amizade de uma vida, obrigada por existires e por seres uma inspiração. Obrigada por seres casa e família. Obrigada por me compreenderes como ninguém, mesmo quando eu própria não consigo. Obrigada por dizeres sempre o que preciso de ouvir e não necessariamente o que eu gostaria. Obrigada por seres a mão estendida, no meio de todas as outras que insistem em manter-nos em baixo. Obrigada pela força e encorajamento que me deste para completar esta e outras etapas e, principalmente, pela pessoa bonita que és.

Finalmente, um agradecimento muito especial aos meus patudos que me mostram todos os dias que fiz a escolha certa ao abraçar esta profissão e que me dão força e motivação para continuar este percurso e ser cada vez melhor.

Peritonite Infeciosa Felina: correlação entre formas clínicas e a detecção de mutações virais

Resumo

O coronavírus felino (FCoV) apresenta dois biótipos distintos, o FECV e o FIPV. Este último é formado a partir de mutações ocorrentes no FECV, sendo responsável pelo desenvolvimento de peritonite infecciosa felina (PIF) em cerca de 10% dos felídeos infetados. A doença resulta de uma desregulação imunitária, podendo apresentar três formas clínicas (húmida, seca e mista), as quais estão dependentes do tipo de resposta imunitária desenvolvida pelo animal. Existem ainda inúmeros fatores capazes de predispor o animal ao aparecimento de PIF, nomeadamente fatores genéticos e ambientais, entre outros.

A PIF constitui assim uma doença sistémica progressiva e fatal, para a qual não existe qualquer fármaco licenciado capaz de promover cura definitiva. Todavia, recentemente têm vindo a ser reportados resultados promissores associados a terapêuticas com recurso a GS-441524 e GC 376. Ambos os agentes interferem com o processo de replicação viral, um através do término do processo de transcrição do RNA viral e o outro ao bloquear a clivagem da poliproteína viral.

A presente investigação teve como principal objetivo a identificação da possível associação entre a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação e a forma clínica apresentada. O estudo incluiu todos os felídeos diagnosticados com PIF na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no período compreendido entre outubro de 2013 e junho de 2021. O método de diagnóstico definitivo utilizado foi a técnica de RT-PCR em tempo real simples ou com recurso a pirosequenciação para deteção de mutações virais. As amostras utilizadas em ambas as técnicas consistiam em amostras de líquido de derrame, amostras colhidas por punção aspirativa com agulha fina ou biópsias de lesões, líquido retroperitoneal e ainda líquido cefalorraquidiano.

A análise dos dados desta pesquisa revelou que a totalidade dos gatos com mutação S1060A (n=3, 100%) apresentou forma efusiva da doença, apesar desta associação não se ter mostrado estatisticamente significativa. Porém, este resultado foi fortemente influenciado pela pequena amostragem, tornando-se importante a repetição deste estudo numa população mais representativa.

Palavras-chave: coronavírus, mutação, peritonite infecciosa felina.

Feline Infectious Peritonitis: correlation between clinical forms and viral mutation detection

Abstract

Feline coronavirus (FCoV) presents two distinct biotypes, the FECV and FIPV. The latter is formed from mutations that take place in the original FECV and is responsible for the development of feline infectious peritonitis (FIP) in about 10% of the infected felids.

The disease results from an immune dysregulation, and may present three different clinical forms (wet, dry and mixed), which depend on the type of immune response developed by the animal. There are still many factors capable of predisposing the animal to the onset of FIP, including genetic and environmental factors, among others.

FIP is a progressive and fatal systemic disease, for which there is no licensed drug available capable of achieving a definitive cure. However, promising results associated with therapies using GS-441524 and GC 376 have recently been reported. Both drugs interfere with the viral replication process, one by blocking the viral RNA transcription process and the other by blocking the viral polyprotein cleavage.

The main purpose of the present investigation was to identify the possible association between the mutation detected by real-time RT-PCR with pyrosequencing and the presented clinical form. This study included all felids diagnosed with FIP at the Isolation and Biological Containment Unit of the Teaching Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Lisbon, in the period between October 2013 and June 2021. The definitive diagnostic method used was the simple real-time RT-PCR technique or using additionally pyrosequencing to detect viral mutations. The samples accepted in both techniques consisted in samples of effusions, samples collected by fine needle aspirates or biopsies of the lesions, retroperitoneal fluids and cerebral spinal fluid.

Data analysis of this research revealed that all cats with the S1060A mutation (n=3, 100%) had effusive form of the disease, although this association did not shown to be statistically significant. However, this result was strongly influenced by the small number of cats included in this analysis, making it important to repeat this study in a more representative population.

Keywords: coronaviruses, feline infectious peritonitis, mutation.

Índice

Declaração Relativa às Condições de Reprodução da Dissertação	ii
Agradecimentos	iii
Peritonite Infeciosa Felina: correlação entre formas clínicas e a detecção de mutações virais ...	v
Resumo	v
Feline Infectious Peritonitis: correlation between clinical forms and viral mutation detection	vi
Abstract.....	vi
Índice	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de gráficos.....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiv
Descrição do estágio curricular	1
Capítulo I: Revisão Bibliográfica	4
1. Coronavírus felino.....	5
1.1.Taxonomia e Genoma viral	5
1.2.Serotipos e biótipos.....	6
1.3.Origem do vírus da peritonite infecciosa felina.....	7
2. Epidemiologia e patogênese	10
3. Apresentação clínica e sinais clínicos	16
3.1.Sinais clínicos associados à infecção por FECV	16
3.2.Infecção pelo FIPV.....	16
4. Diagnóstico	20
4.1.Diagnósticos diferenciais.....	21
4.2.Hematologia e bioquímicas séricas.....	21
4.2.1. Medição da concentração de proteínas de fase aguda.....	22
4.3.Urianálise.....	22
4.4.Análise de líquido de derrame.....	22
4.5.Análise do líquido cefalorraquidiano.....	23
4.6.Análise do humor aquoso.....	23
4.7.Imagiologia.....	24
4.8.Serologia.....	25
4.9.Deteção de RNA de FCoV por reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real	26
4.10. Deteção de antígeno de FCoV por imunocoloração	26
4.11. Necrópsia e Histopatologia.....	27
5. Tratamento.....	28
5.1.Tratamentos futuros	31
6. Prognóstico.....	31
7. Prevenção.....	32
Capítulo II: Peritonite Infeciosa Felina, correlação entre formas clínicas e detecção de	

mutações virais	33
8. Objetivos.....	34
9. Materiais	34
9.1. Tipo de estudo, critérios de inclusão e população-alvo	34
10. Métodos	34
10.1. Métodos de diagnóstico.....	34
10.2. Exame clínico	34
10.3. Classificação das formas clínicas	35
10.4. Fontes de dados.....	35
10.5. Análises estatísticas	35
11. Resultados.....	36
11.1. Caracterização da população de felídeos diagnosticados com PIF na UICB por meio de métodos de diagnóstico molecular	36
11.1.1. Sexo e estatuto reprodutivo.....	36
11.1.2. Idade.....	36
11.1.3. Raça	36
11.1.4. Origem.....	37
11.1.5. Estilo de vida.....	37
11.1.6. Número de felídeos coabitantes.....	38
11.1.7. Caracterização temporal dos casos de PIF	39
11.1.8. Tipo de consulta de admissão.....	39
11.1.9. Presença e tipo de doenças concomitantes	40
11.1.10. Apresentação Clínica.....	41
11.1.10.1. Formas clínicas	41
11.1.10.2. Sinais clínicos.....	42
11.1.11. Caracterização da hospitalização	44
11.1.12. Seguimento após primeira hospitalização	44
11.1.13. Caracterização do desfecho infeto contagioso	45
11.2. Métodos de diagnóstico definitivo.....	46
11.2.1. Mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação.....	46
11.3. Correlação entre as formas clínicas e a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação	47
11.4. Análise de sobrevivência	48
12. Discussão	51
12.1. Sexo e estatuto reprodutivo da população-alvo.....	51
12.2. Idade	52
12.3. Raça.....	53
12.4. Origem	53
12.5. Estilo de vida	54
12.6. Número de felídeos coabitantes	54
12.7. Caracterização temporal do número de casos.....	55

12.8.	Tipo de consulta	56
12.9.	Doença concomitante	56
12.10.	Formas clínicas apresentadas	58
12.11.	Sinais clínicos apresentados nas diferentes formas clínicas	58
12.12.	Hospitalização	60
12.13.	Seguimento	60
12.14.	Desfecho infeto contagioso	61
12.15.	Métodos de diagnóstico definitivo e mutação detetada	61
12.16.	Correlação entre as formas clínicas e a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação	62
12.17.	Análise de sobrevivência	63
13.	Limitações do estudo	64
14.	Conclusão	64
15.	Bibliografia	66
16.	Anexos	71

Índice de figuras

Figura 1. Felídeo de raça Sagrado da Birmânia, macho inteiro de 5 anos com PIF e presença de precipitados queráticos (Sykes 2013)	19
Figura 2. Hidrocefalia obstrutiva num felídeo macho castrado de 8 meses de idade, de raça Exótico de pelo curto, o qual desenvolveu ataxia e tremores (Sykes 2013)	19
Figura 3. Fêmea inteira de 1 ano de idade, sem raça definida, hospitalizada na UICB com forma mista de PIF na fase inicial de progressão da doença. Apresentou, nesta fase, quadro de colite grave e piréxia. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB	41
Figura 4. Fêmea inteira de 1 ano de idade, sem raça definida, hospitalizada na UICB com forma mista de PIF, apresentando distensão abdominal, secundária a derrame peritoneal, na fase terminal da doença. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB	41
Figura 5. Líquido de derrame abdominal de um felídeo com PIF, hospitalizado na UICB, colhido por abdominocentese. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB...	43

Índice de gráficos

Gráfico 1. Classificação da população-alvo consoante os diferentes escalões etários (N=23)	36
Gráfico 2. Classificação da população-alvo de acordo com respetiva raça de cada felídeo (N=23)	37
Gráfico 3. Caraterização da população-alvo de acordo com a origem de cada felídeo (N=23)	37
Gráfico 4. Caraterização da população-alvo de acordo com o estilo de vida adotado por cada felídeo (N=23)	38
Gráfico 5. Caraterização da população-alvo quanto ao número de felídeos coabitantes (N=23)	38
Gráfico 6. Caraterização temporal da população-alvo de acordo com o mês de admissão para consulta e/ou hospitalização dos felídeos na UICB (N=23)	39
Gráfico 7. Caraterização da população-alvo de acordo com o tipo de consulta de admissão realizada (N=23)	40
Gráfico 8. Caraterização da população-alvo de acordo com a presença e tipo de doença concomitante (N=23)	40
Gráfico 9. Caraterização da população-alvo de acordo com a forma clínica de PIF apresentada (N=23)	41
Gráfico 10. Identificação do tipo de derrame desenvolvida durante o quadro clínico de PIF dos felídeos admitidos na UICB que apresentaram derrames cavitários (n=18)	43
Gráfico 11. Caraterização da população-alvo de acordo com a ocorrência e duração em dias da hospitalização nas instalações da UICB (N=23)	44
Gráfico 12. Seguimento dos felídeos que obtiveram alta após primeira hospitalização na UICB (N=11)	45
Gráfico 13. Caraterização da população-alvo de acordo com o desfecho infeto contagioso final (N=23)	46
Gráfico 14. Método de diagnóstico definitivo aplicado aos felídeos constituintes da população-alvo (N=23)	46
Gráfico 15. Mutações detetadas nos felídeos admitidos na UICB testados pela técnica de PCR de transcriptase reversa em tempo real (N=12)	47
Gráfico 16. Análise de sobrevivência através da execução de uma curva Kaplan-Meier com intervalo de confiança (IC) de 95%, a qual demonstra a associação entre a probabilidade de sobrevivência de um felídeo com PIF e o número de dias decorridos entre o início dos sinais clínicos e a sua morte ou última avaliação	48
Gráfico 17. Análise de sobrevivência através da execução de uma curva Kaplan-Meier com intervalo de confiança (IC) de 95%, a qual demonstra a associação entre a probabilidade de	

sobrevivência de um felídeo com PIF e o número de dias decorridos entre o início dos sinais clínicos e a sua morte ou última avaliação para cada forma clínica49

Índice de tabelas

Tabela 1. Caracterização da sintomatologia da população-alvo de acordo com a forma clínica apresentada por cada felídeo ao longo de todo o quadro clínico de PIF (N=23)	42
Tabela 2. Correlação entre as formas clínicas apresentadas e a mutação detetada nos felídeos admitidos na UICB que realizaram RT-PCR em tempo real com pirosequenciação (N=10)	47
Tabela 3. Tabela de sobrevivência referente ao gráfico 16	71
Tabela 4. Tabela de sobrevivência referente ao gráfico 17	71

Lista de abreviaturas e siglas

AGP – alfa 1- glicoproteína
AINES – anti-inflamatórios não esteróides
CCoV – coronavírus canino
CID – coagulação intravascular disseminada
CIF – cistite idiopática felina
DRC – Doença renal crónica
DTRSF – doença do trato respiratório superior felino
ELISA – teste de imunoabsorção enzimática
FCoV – coronavírus felino
FECV – coronavírus entérico felino
FeLV – vírus da leucemia felina
FIPV – vírus da peritonite infecciosa felina
FIV – vírus da imunodeficiência felina
FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
G-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos
GM-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
HE – Hospital Escolar
ICC – imunocitoquímica
IF – imunofluorescência
IFN- γ – interferão gama
IFN- ω – interferão ómega
IHC – imunohistoquímica
IL – interleucina
ITU – infeção do trato urinário
Kb – kilobases
LCR – líquido cefalorraquidiano
PAAF – punção aspirativa com agulha fina
PIF – peritonite infecciosa felina
RNA – ácido ribonucleico
RT-PCR – reação em cadeia de polimerase de transcriptase reversa
TGEV – vírus da gastroenterite transmissível
TGI – trato gastrointestinal
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
UICB – unidade de isolamento e contenção biológica
VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

χ^2 – qui-quadrado

Descrição do estágio curricular

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, correspondente à área de Sanidade Animal, foi realizado em dois locais distintos e apresentou uma carga horária total de 752 horas. A primeira parte teve lugar na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), no período decorrente entre dia 21 de setembro de 2020 e dia 21 de dezembro de 2020, sob a orientação da Professora Doutora Solange Gil Neves e supervisão da Dra. Inês Machado, contabilizando uma carga horária de cerca de 504 horas. A segunda parte foi realizada no Centro Veterinário Ponto Vet, no período decorrente entre dia 1 de janeiro de 2021 e dia 1 de fevereiro de 2021, sob a tutoria do Dr. Cláudio Cabral, com uma carga horária de 248 horas. O estágio na UICB foi organizado em turnos semanais rotativos, das 9h às 16h ou das 14h às 20h, incluindo ainda, na sua totalidade, a realização de 7 sábados, com horário compreendido entre as 10h e as 16h. No Centro Veterinário Ponto Vet o horário semanal era compreendido entre as 10h30 e as 14h30, recomeçando das 16h até às 20h após pausa estipulada para almoço. Na UICB foi assim cumprido um regime entre 35 horas a 41 horas semanais, dependendo da realização de sábado, enquanto no Centro Veterinário Ponto Vet o regime foi de 40 horas semanais.

No decorrer do estágio na UICB pude familiarizar-me com todas as normas de biossegurança adoptadas numa unidade desta natureza. Segundo estas normas aprendi: qual o equipamento de proteção individual (EPI) a escolher e como o colocar e retirar corretamente antes e depois do contacto com cada paciente, respetivamente; a proceder à correta higienização e desinfeção das mãos à entrada e saída da unidade e entre cada paciente; como executar a limpeza e desinfeção dos materiais e jaulas presentes no internamento e os períodos de quarentena adequados a cada situação. Relativamente aos EPIs, o mais usual inclui a colocação de touca, bata, luvas, proteção de calçado e máscara cirúrgica descartável, porém, em casos de doenças zoonóticas, devem ser utilizados óculos de proteção e fatos de macaco descartáveis para uma proteção acrescida. Todos os materiais, superfícies e jaulas são limpas e desinfetadas no início de cada turno e após manipulação de cada animal incluindo estetoscópios, termómetros, tesouras, taças de água e comida, marquesa, entre outros. As diferentes salas de internamento e jaulas, após alta do animal, são limpas e desinfetadas, sendo sujeitas a períodos de quarentena estipulados de acordo com o agente infeccioso em questão.

No decorrer do estágio, executei procedimentos como: execução diária de limpeza, alimentação e exames físicos dos animais internados e respetivo registo da informação obtida nos programas hospitalares utilizados, colheitas de sangue, colocação de cateteres e sondas de alimentação nasográstica, colocação e remoção de pensos simples, limpeza e

desinfecção de feridas cutâneas, algaliação, preparação e administração da medicação dos pacientes em internamento (via oral, subcutânea, intravenosa, muscular e tópica), execução dos cálculos necessários para a administração de fluidoterapia e respetivos suplementos e ainda monitorização de transfusões. Tive ainda a oportunidade de assistir e ajudar na realização de exames complementares de diagnóstico de alguns animais, como radiografias e ecografias, consultas de segunda opinião e de referência. Aprendi ainda a realizar relatórios de alta clínica, sob supervisão da Dra. Inês Machado, participei na discussão de casos e procedi à apresentação mensal de um caso clínico de relevância. Acompanhei vários casos clínicos desde a sua hospitalização até ao seu desfecho, alguns deles, casos de peritonite infecciosa felina (PIF), com os quais pude perceber o impacto clínico e gravidade desta doença com um olhar mais próximo, despertando assim um interesse acrescido pela mesma. Procedimentos como a execução de altas clínicas, contactos telefónicos com os tutores para marcar visitas ou informar o estado do seu animal, gestão de situações delicadas como eutanásia, entre outras, foram cruciais no desenvolvimento das minhas competências de comunicação e estabelecimento de empatia com os tutores dos pacientes. Desenvolvi ainda as minhas competências de trabalho em equipa e cooperação com os meus colegas estagiários e restante equipa da UICB.

Na segunda parte do estágio curricular, no Centro Veterinário Ponto Vet, pude aprofundar os meus conhecimentos de Medicina Interna e Cirurgia. Assisti a consultas de primeira e segunda opinião, bem como consultas de referência, em especial, da área de Ortopedia. Ajudei na realização de exames complementares de diagnóstico, como radiografias e ecografias, e na preparação de animais para diversos procedimentos cirúrgicos. Preparei a medicação e indicações de alta, sob a supervisão da Dra. Catarina Silva e Dra. Juliana Pereira. Em regime de internamento, ajudei em diversos procedimentos como colocação e remoção de cateteres, administração de medicação e/ou fluidoterapia, execução de pensos simples e ainda prestação de cuidados de higiene e alimentação, incluindo pacientes com sondas esofágicas. No decorrer deste período pude acompanhar casos extremamente diversificados, permitindo-me desenvolver e aprofundar os meus conhecimentos nas diferentes áreas como endocrinologia, dermatologia, ortopedia e oncologia. Na Cirurgia, sob a supervisão do Dr. Claudio Cabral, pude assistir e participar em procedimentos como osteotomia de nivelamento do plateau tibial (TPLO), esplenectomia, colocação de sondas esofágicas, entre outros. Finalmente, assisti e participei em consultas de urgência, onde aprendi a importância do trabalho em equipa e coordenação da mesma para que tudo corra da melhor forma, mas também a gestão e a abordagem clínica a adoptar nestas situações.

Ambos os locais de estágio proporcionaram experiências enriquecedoras e gratificantes tanto a nível profissional, como pessoal, fomentando o trabalho em equipa e

consolidação de conhecimentos previamente adquiridos.

Capítulo I: Revisão Bibliográfica

1. Coronavírus felino

1.1. Taxonomia e Genoma viral

O coronavírus felino (FCoV) é um alfacoronavírus, pertencente à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* (Greene 2011, Sykes 2013). O seu genoma é formado por uma cadeia simples de RNA de sentido positivo e possui, aproximadamente, 29 kb, representando um dos maiores genomas de RNA viral. A sua configuração é esférica, apresentando uma nucleocápside, de estrutura helicoidal, e um envelope lipídico externo, cujas funções se prendem com a estabilização e proteção do RNA viral (Greene 2011, Jaimes and Whittaker 2018).

Os coronavírus são classificados em 4 géneros distintos, os *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Os vírus pertencentes ao género *Alphacoronavirus* são capazes de infetar uma vasta gama de hospedeiros, entre os quais furões, gatos, cães, suínos, humanos, entre outros. O FCoV, juntamente com o coronavírus canino (CCoV) e o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), integram as espécies de *Alphacoronavirus 1* (Kipar and Meli 2014, Whittaker et al. 2018).

O FCoV possui um genoma que codifica várias proteínas, estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais incluem a proteína S, a nucleocápside, a membrana e o envelope, e das não estruturais destacam-se as acessórias 3 (a,b,c) e 7 (a,b) (Tekes and Thiel 2016, Jaimes and Whittaker 2018).

A proteína S é provavelmente a mais relevante de todas as proteínas estruturais, visto ser essencial nos processos de entrada, ligação ao receptor na célula-alvo e fusão da membrana viral, além de constituir o principal antígeno de superfície do vírus. Esta glicoproteína do envelope é, ainda, considerada de extrema relevância para a transmissão e patogénese viral, uma vez que influencia o tropismo celular e é parte determinante na capacidade do agente infetar uma vasta gama de hospedeiros e tecidos (Whittaker et al. 2018). A proteína S, pertence à classe I das proteínas de fusão viral, apresenta uma estrutura secundária em alfa-hélice e compreende 2 subunidades: a S1 e a S2. A S2 encontra-se numa posição transmembranar, tendo como função a ancoragem da própria proteína à célula. Por sua vez, a S1 está numa posição mais exterior, sendo crucial para processo de adesão do vírus, bem como, para a neutralização por parte dos anticorpos e determinação do serotipo viral (Drechsler et al. 2011; Jaimes and Whittaker 2018).

As proteínas acessórias, 3 abc e 7 ab, cujas funções específicas ainda não são totalmente claras, têm sido alvo de vários estudos. A proteína 3c, especificamente, aparenta ser fundamental no processo de replicação viral e tem sido associada a alterações de virulência e tropismo do FCoV (Jaimes and Whittaker 2018). Segundo Chang et al. (2010), a perda de função por parte da proteína 3c parece estar associada à perda de capacidade de replicação do vírus a nível intestinal. As proteínas 7 ab, por sua vez,

desempenham um papel importante na resposta imunitária à infecção pelo FCoV. A proteína 7a representa um antagonista tipo I de interferão (INF), cuja função assenta na proteção das partículas virais, interferindo com a resposta imunitária induzida pelo INF. Por outro lado, a proteína 7b, constitui uma glicoproteína, que tem vindo a ser associada à indução de uma resposta humoral, com produção de anticorpos, em gatos com infeção natural (Kipar and Meli 2014, Jaimes and Whittaker 2018).

1.2. Serotipos e biótipos

A nível antigénico, os FCoV são divididos em 2 serotipos diferentes, o serotipo I e o II. A sua classificação é baseada na sequência de aminoácidos que a proteína S apresenta e na neutralização por parte dos anticorpos monoclonais, sendo estas diferenças dependentes da origem genética do agente (Greene 2011, Jaimes and Whittaker 2018). O serotipo I é predominante a nível mundial, atingindo cerca de 98% de prevalência em animais seropositivos, e deriva exclusivamente do FCoV (Kipar and Meli 2014, Jaimes and Whittaker 2018). O serotipo II, à semelhança do reportado para outros coronavírus, é obtido através de uma recombinação genética entre estirpes de FCoV, pertencentes ao serotipo I, e o CCoV (Terada et al. 2014, Jaimes and Whittaker 2018). A semelhança entre a proteína S presente nas estirpes do serotipo II e a presente no CCoV, constitui um dos principais fatores que suportam esta teoria e parece ter um papel fundamental na facilidade e rapidez de crescimento *in vitro* destas estirpes (Terada et al. 2014, Jaimes and Whittaker 2018). O isolamento e propagação em cultura de células do serotipo I é considerado árduo, e como tal, apesar da sua maior importância a nível clínico e epidemiológico, dada a sua prevalência, o serotipo II continua a ser o mais utilizado para fins experimentais (Greene 2011, Jaimes and Whittaker 2018). As manifestações clínicas provocadas são idênticas em ambos os serotipos, apesar das diferenças significativas apresentadas nos receptores de entrada celular (Sykes 2013).

O FCoV apresenta 2 biótipos, o Coronavírus Entérico Felino (FECV) e Vírus da Peritonite Infeciosa Felina (FIPV), os quais são idênticos do ponto de vista morfológico e serológico, e ambos podem pertencer a qualquer um dos serotipos existentes (Kipar and Meli 2014, Jaimes and Whittaker 2018). O FECV é um agente ubíquo, responsável por infeções benignas, a nível intestinal, caracterizadas maioritariamente por quadros de enterite moderada ou sem sintomatologia aparente. Este biótipo é, ainda capaz de provocar infeções persistentes e, menos frequentemente, induzir quadros de enterite grave (Tekes et al. 2012, Tekes and Thiel 2016). O FIPV, ao contrário do anterior, é responsável pelo desenvolvimento de uma doença sistémica fatal, designada peritonite infecciosa felina (PIF), a qual é caracterizada pela formação de piogranulomas disseminados e lesões inflamatórias nas membranas serosas (Drechsler et al. 2011, Chang et al. 2012).

Anteriormente, era aceite que a principal diferença entre os dois biótipos residia no

seu tropismo para células-alvo distintas. Desta forma, o FECV foi considerado um vírus exclusivamente entérico, infectando apenas o epitélio intestinal sem capacidade de ultrapassar a barreira gastrointestinal, ao passo que o FIPV, considerado um agente sistêmico, teria um tropismo aumentado para os monócitos e macrófagos, nos quais se replica, invadindo a circulação e induzindo doença (Kipar and Meli 2014, Porter et al. 2014). Contudo, foram realizados vários estudos que contestaram esta visão demonstrando a capacidade de disseminação sistêmica por parte de estirpes pertencentes ao biótipo FECV. Nestes estudos foi demonstrado que, não só o vírus tem a capacidade de se disseminar a partir do local de infecção inicial, através de uma virémia associada a monócitos, em animais saudáveis (Kipar et al. 2010), mas também evidências de que cerca de 80 a 90% dos gatos saudáveis apresentam virémia transitória (Gunn-Moore et al. 1998). Contudo, sabe-se que, apesar do FECV apresentar a capacidade de replicação nos monócitos, o FIPV aparenta replicar-se em maior número (Kipar and Meli 2014). Alguns destes estudos investigaram, ainda a persistência do agente nos vários órgãos de animais sãos, sendo o cólon considerado o principal órgão de persistência do vírus (Kipar et al. 2010).

1.3. Origem do vírus da peritonite infecciosa felina

O FCoV apresenta uma seropositividade que ronda os 90% na população felina (Drechsler et al. 2011, Tekes et al. 2012). No entanto, apesar da elevada incidência de infecção e existência de animais portadores crônicos, os quais excretam cronicamente o vírus sem sintomatologia aparente, menos de 10% dos animais desenvolvem PIF. A principal questão que se coloca é a razão pela qual alguns destes animais desenvolvem quadros de PIF e outros permanecem saudáveis. Existem 3 hipóteses propostas para explicar esta situação: a hipótese da circulação de estirpes virulentas e avirulentas, a hipótese da mutação interna e, por fim, a proposta de que ambas as hipóteses possam ser válidas (Sykes 2013). A hipótese da circulação de estirpes virulentas e avirulentas, a qual defende a coexistência de estirpes de FCoV com virulências distintas na população felina, explica que a infecção por uma estirpe virulenta em combinação com fatores genéticos individuais e ambientais predisponentes pode levar ao desenvolvimento de PIF (Brown et al. 2009, Sykes 2013). Por sua vez, a teoria da mutação interna, atualmente a mais aceita, defende que o FIPV se origina a partir do FECV, através da ocorrência de determinadas mutações no mesmo (Tekes et al. 2012, Pedersen 2014). Esta teoria tem vindo a ser suportada por várias pesquisas que, ao longo do tempo, têm vindo a associar as mais variadas mutações à conversão do FECV em FIPV (Licitra et al. 2013, Bank-Wolf et al. 2014, Oguma et al. 2018), sendo que estas mutações podem ocorrer logo após infecção inicial ou anos mais tarde (Sykes 2013). Vários estudos foram realizados para tentar identificar as mutações responsáveis por esta conversão, tendo os genes acessórios e o gene codificante da

proteína S sido considerados os locais mais prováveis para a ocorrência das mesmas e, consequentemente, associados ao desenvolvimento de PIF (Tekes and Thiel 2016).

Deleções no gene 7ab têm sido propostas como mutações associadas ao desenvolvimento de PIF (Tekes and Thiel 2016). O gene 7a foi alvo de vários estudos, incluindo um realizado com gatos Persa, no qual se procedeu à sua análise sequencial a partir de estirpes de FECV e FIPV, obtidos desses mesmos animais, tendo sido proposto que deleções neste gene seriam características do FIPV (Kennedy et al. 2001). No entanto, estas mutações não são, atualmente, consideradas cruciais na alteração dos biótipos do FCoV (Tekes and Thiel 2016). O gene 7b foi também avaliado em alguns estudos, nos quais se concluiu que os vírus com deleções apresentavam uma redução da virulência em infecções experimentais (Dedeurwaerder et al. 2013), porém estas mesmas deleções não eram exclusivas do biótipo FIPV, aparecendo igualmente no FECV (Lin et al. 2009).

O gene 3c, crucial para a replicação no epitélio intestinal, foi também foco de algumas destas investigações, sendo considerado alvo de mutações em maior parte do FIPVs e intacto na maior parte dos FECVs, o que suporta a ideia de que tenha um papel na conversão de um biótipo para outro (Vennema et al. 1998, Chang et al. 2010, Pedersen et al. 2012). As mutações identificadas consistiam em deleções e introdução de codões stop prematuros, as quais provocavam o aparecimento de uma proteína truncada (de menor tamanho) ou a ausência completa da transcrição da proteína, respetivamente, levando em ambos os casos a uma perda de função da mesma (Pedersen 2009). Contudo, estudos recentes vieram constatar estas descobertas, demonstrando a presença de FIPVs com gene 3c mutado nas fezes, assim como presença de FIPVs com gene 3c intacto, tanto nas fezes, como em amostras de líquidos de derrame. À luz destes achados, para além de não poder excluir-se a possibilidade de ocorrência de transmissão horizontal do FIPV, foi ainda proposta a hipótese de que mais do que um gene mutado possa ser responsável pela conversão de biótipo (Bank-Wolf et al. 2014). Atualmente, é considerado mais provável que as mutações, ocorrentes no gene 3c, não constituam efetivamente marcadores de virulência para PIF, mas sejam antes uma consequência da disseminação sistémica e aumento da replicação dos FIPVs (Tekes and Thiel 2016).

Recentemente, a pesquisa e análise do gene S tem sido o principal foco das investigações. Este gene codifica a proteína S, sendo esta uma peça crucial para o processo de ligação ao receptor e entrada celular. Sabendo que a conversão entre biótipos de FCoV envolve diferenças no tropismo dos vírus para as células-alvo, não se torna surpreendente a proposta de que mutações no gene S, por si só ou em combinação com alterações noutros genes, possam contribuir para a conversão do FECV em FIPV (Tekes and Thiel 2016). Neste sentido, Chang et al. (2012) realizou um estudo, no qual se procedeu à análise do genoma completo de FIPV e FECV, onde foram identificadas duas mutações pontuais no gene S, as quais se correlacionavam com o fenótipo de PIF na

maioria dos casos. As mutações descritas consistiam em 2 substituições nos nucleótidos 23531 e 23537, as quais dão origem a uma alteração dos aminoácidos presentes na sequência da proteína S. A primeira mutação, designada M1058L, corresponde a uma substituição de uma metionina por uma leucina na posição 1058, e a segunda, designada S1060A, corresponde a uma substituição de uma serina por uma alanina na posição 1060. Neste estudo, observou-se a presença de uma ou ambas as mutações em aproximadamente 96% dos FIPVs e a sua ausência em todos os FECVs submetidos a análise, o que levou os autores a concluir que, para além de um fator discriminatório entre os biótipos do FCoV, a aquisição do tropismo para os monócitos e macrófagos, e a consequente disseminação sistémica e desenvolvimento de PIF, seria responsabilidade das referidas mutações (Chang et al. 2012). Vários estudos seguintes obtiveram resultados semelhantes ao anterior, estando as mutações presentes na maioria dos FIPVs, apoiando a ideia de que estas estariam associadas à conversão dos biótipos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da doença (Lewis et al. 2015, Oguma et al. 2018, Sangl et al. 2019). Curiosamente, um dos estudos acima mencionados identificou uma nova mutação, no nucleótido 23486, presente no domínio S2, a qual teve como resultado a substituição de uma isoleucina para treonina na posição 1108 da sequência de aminoácidos da proteína S. Esta mutação esteve presente em todas as amostras de PIF e ausente em todas as outras, o que levou os autores a concluir que representa mais uma mutação útil na distinção dos biótipos do agente (Lewis et al. 2015). Contudo, uma investigação recente veio contrapor esta permissão, afirmando que a mutação M1058L seria, mais provavelmente, um marcador de infeção sistémica pelo FCoV, em oposição a um marcador de PIF como inicialmente pensado (Porter et al. 2014). Neste estudo, procedeu-se à colheita de amostras de fezes e tecidos *post-mortem*, de gatos com e sem PIF, nas quais se pesquisou a presença da mutação M1058L. Os resultados da investigação levaram os autores a afirmar que a referida substituição não se correlacionava com o fenótipo de PIF, como proposto anteriormente, sendo esta conclusão baseada em duas observações distintas. Primeiro demonstrou-se, em concordância com outros trabalhos, que o codão de leucina estava presente na maioria (91%) das amostras de tecidos de animais com PIF, no entanto a mutação foi também detetada em 89% das amostras de tecidos de felídeos sem PIF. Contudo, foi referido que devido ao procedimento de colheita de amostras ter sido realizado *post-mortem*, não se pode excluir a possibilidade de que os 6 animais sem doença e com mutação pudessem ter vindo a desenvolver PIF, caso não tivessem sido eutanaziados por outros motivos. Em adição, foi ainda encontrada um número significativo (9%) de amostras de tecidos de gatos com PIF que apresentavam metionina na posição 1058 (Porter et al. 2014).

Existe ainda uma hipótese proposta por vários autores, a qual defende que mais do que uma mutação possa estar na base da conversão do biótipo. Segundo os resultados

obtidos por Bank-Wolf et al. (2014), observou-se que 13 dos 15 FIPV, obtidos de amostras de ascite, continham alterações no gene 3c e que os 2 restantes apresentavam alterações no gene S. Em adição, verificou-se que apenas 1 dos FIPV obtidos de amostras de fezes com 3c intacto e 1 dos FIPV obtidos de amostra de ascite com 3c truncado, não possuíam mutações no gene da proteína S. Estes achados, além de fornecerem suporte à hipótese de que mutações do gene 3c e S estariam envolvidas na conversão dos biótipos, levaram os autores a considerar que possa existir uma interação entre ambas as proteínas 3c e S. Em concordância com a pesquisa anterior, um estudo recente abordou esta temática, fornecendo novo apoio a esta hipótese. Os resultados alcançados, após a análise de amostras de derrames cavitários e tecidos, demonstraram que, em adição às mutações M1058L e S1060A presentes no gene S, uma mutação truncada do gene 3c constitui outro fator genético relativamente característico dos FCoV presentes neste tipo de amostras (Oguma et al. 2018). Apurou-se ainda, que a grande maioria dos FCoVs (80%), obtidos das amostras de líquidos de derrame, possuíam ambas as mutações, M1058L ou S1060A, juntamente com a mutação do gene 3c. Considerando os achados acima citados, aliados ao conhecimento de que a maioria das amostras fecais, analisadas no presente estudo, não exibiam nenhuma das mutações mencionadas, os autores foram levados a sugerir que mutações em um ou ambos os genes estariam envolvidas na alteração do tropismo do FCoV (Oguma et al. 2018).

2. Epidemiologia e patogênese

O FCoV, agente etiológico da PIF, é capaz de provocar doença tanto em felídeos domésticos como selvagens (Jaimes and Whittaker 2018). A infecção tem sido reportada nas mais variadas espécies de felídeos selvagens, dos quais são exemplo gato selvagem europeu (*Felis silvestris*), leão (*Panthera leo*), tigre (*P. tigris*), jaguar (*P. onca*) e leopardo (*P. pardus*), sendo a chita (*Acinonyx jubatus*) considerada uma espécie particularmente vulnerável ao FIPV (Heeney et al. 1990, Greene 2011).

Este agente apresenta seroprevalência elevada, em particular em ambientes com múltiplos gatos, chegando a atingir os 90% de seropositividade em certas populações, podendo alguns animais permanecer seropositivos por 10 ou mais anos (Drechsler et al. 2011). Em ambientes com múltiplos gatos, os animais são repetidamente infectados, iniciando a excreção viral, e posteriormente podem recuperar ou tornar-se persistentemente infectados, excretando o vírus cronicamente no ambiente, situação esta que contribui para o aumento da exposição ao agente (Sykes 2013). Existem vários fatores capazes de influenciar a frequência de infecção pelo vírus, como a densidade populacional, as práticas de criação e o tempo de permanência dos animais nos diferentes ambientes (Drechsler et al. 2011). Segundo a investigação de Cave et al. (2004), tempos de permanência prolongados em abrigos foram associados a aumento do risco de

seropositividade, sendo que em animais que permanecem mais de 60 dias o aumento do risco parece estar associado a uma mudança de gestão para habitação comunitária. Apesar da elevada seroprevalência do FCoV na população, apenas uma minoria dos animais desenvolve PIF, existindo vários factores de risco que, ao longo do tempo, têm vindo a ser associados à sua ocorrência (Sykes 2013).

A PIF constitui uma das causas mais frequentes de morte em gatos jovens e jovens adultos, em particular em animais que habitam em ambientes com múltiplos gatos, como acontece em abrigos e instalações de criadores. A maioria dos gatos desenvolve a doença entre os 3 meses e os 3 anos de idade, sendo que cerca de 50% desenvolve aos 12 meses ou mais cedo (Sykes 2013). Caso os gatinhos sejam infetados antes da completa maturação do seu sistema imunitário, os níveis de replicação do FECV serão notoriamente mais elevados, o que consequentemente irá favorecer as mutações responsáveis pela conversão do FECV em FIPV. Em adição, a imunodeficiência inerente à faixa etária destes animais poderá prejudicar a capacidade de contenção de vírus mutantes que possam surgir, predispondo os mesmos ao aparecimento de doença (Pedersen et al. 2008). Existe ainda, um segundo pico de incidência em animais geriátricos, acima de 10 anos, provavelmente devido a uma função imunitária enfraquecida. Porém, esta afeção pode atingir animais em qualquer idade (Sykes 2013).

As raças puras parecem estar associadas a uma maior prevalência de PIF, em particular nas raças Sagrado da Birmânia, Ragdoll, Bengal, Rex, Abissínios e Himalaias. Todavia, além da maior predisposição das raças puras para a doença, foi também descrito que algumas linhagens dentro das mesmas possam ser mais responsáveis por este aumento na susceptibilidade que a própria raça em si (Pesteanu-Somogyi et al. 2006).

O sexo e estatuto reprodutivo aparentam ser outros dos factores de risco associados, tendo sido reportada uma maior prevalência de doença em machos e animais inteiros comparativamente com a população geral (Pesteanu-Somogyi et al. 2006, Worthing et al. 2012).

O stress representa outro fator relevante para o desenvolvimento da doença. A movimentação para um novo ambiente, densidade populacional elevada, cirurgias e introdução de novos animais no ambiente são algumas das situações capazes de provocar stress e, consequentemente, aumentar o risco de ocorrência de PIF. Todos os gatos de abrigos ou outros ambientes com múltiplos gatos experienciam algum nível de stress e maior exposição a agentes patogénicos, como tal é expectável uma maior incidência e ocorrência de surtos de PIF nestes ambientes.

Os animais podem ainda apresentar infeções virais concomitantes, como por exemplo, infeção pelo vírus da leucemia felina (FeLV) ou vírus da imunodeficiência felina (FIV), tornando-os mais susceptíveis à doença (Drechsler et al. 2011, Greene 2011). Um trabalho realizado por Poland et al. (1996) em gatos FIV positivos, demonstrou que estes

possuem um comprometimento significativo na sua capacidade de eliminar a infecção pelo FECV. Esta conclusão foi retirada com base na observação de que estes animais apresentavam maiores cargas virais nas fezes e maior duração da excreção viral. Além disso, os gatos FIV positivos apresentaram ainda maior taxa de replicação viral quando comparados com os restantes animais. Esta observação levou os autores a proporem que este aumento da replicação, aliada ao facto de serem animais incapazes de combater eficientemente a infecção viral e o possível aparecimento de vírus mutados, poderia favorecer a seleção de FIPV, contribuindo para o aumento do risco de desenvolvimento de PIF (Poland et al. 1996).

O estilo de vida também parece ter alguma influência, tendo sido reportado que o aumento do número de gatos exclusivamente de interior e a sua detenção em maior número possa ter aumentado a exposição dos animais aos agentes presentes nas fezes, como o FCoV (Greene 2011). No estudo realizado por Luria et al. (2004), foi reportado que a seroprevalência em gatos errantes e ferais era significativamente mais baixa quando comparada com a de gatos domésticos, o que sugere mínima exposição ao FCoV por parte destes animais. Os autores afirmaram que esta diferença se deve, provavelmente, ao diferente comportamento adoptado pelos gatos com este estilo de vida, visto não partilharem caixas de areia, enterrando as fezes no exterior, e apresentarem menor densidade populacional, em oposição ao que acontece com os gatos domésticos.

O vírus possui um envelope lipoproteico, e como tal, pode facilmente ser eliminado por desinfetantes comuns, sendo que a sua sobrevivência à temperatura ambiente é, geralmente, cerca de 1 a 2 dias. Contudo, está descrito que, sob certas circunstâncias, essa sobrevivência pode ser prolongada até 7 semanas, atribuindo às fomites um possível papel determinante na transmissão viral (Sykes 2013). Os gatinhos normalmente infetam-se por volta das 4 a 8 semanas de idade, aquando do decréscimo da imunidade materna, apesar de já terem sido reportadas infeções em pacientes com apenas 2 semanas (Sykes 2013). Em casos de ocorrência de PIF natural, o período de incubação da doença não é conhecido, no entanto, foi demonstrado que, após infecção experimental, o período de incubação varia com a forma clínica da doença, podendo ir de 2 a 14 dias, na forma húmida, até várias semanas, na forma seca (Kipar and Meli 2014).

As fezes constituem a principal fonte de FCoV no ambiente e, como tal, a partilha de caixas de areia representa a fonte primária de infecção oral em grupos de gatos (Addie et al. 2009). A excreção do FCoV através da saliva é rara, tendo sido sugerido que a sua ocorrência se restringe a fases iniciais de infecção, o que propõe que o contato próximo e partilha de comedouros e bebedouros tenham uma menor importância na transmissão viral (Addie and Jarrett 2001). Por fim, apesar de se tratar de um processo raro, foi ainda reportada a ocorrência de transmissão transplacentária (Addie et al. 2009). Uma das principais questões que se coloca sobre a transmissibilidade do FIPV é se existe

transmissão horizontal do agente ou se este processo é conseguido através da mutação interna do FECV (Pedersen 2014). A excreção fecal de FIPV, observada em alguns animais, constitui um dos argumentos que suporta a possível transmissão horizontal da PIF. Contudo, o estudo de Pedersen et al. (2012) veio demonstrar a falha na capacidade de infecção apresentada por este agente, suportando assim a teoria da mutação interna e a permissão de que gatos com PIF não aparentam transmitir eficientemente a doença a outros gatos.

Segundo Pedersen et al. (2008), o estadió primário de infecção pelo FECV tem uma duração de 7 a 18 meses, correspondendo ao período de maior excreção viral, sendo a excreção fecal deste agente significativamente mais elevada em gatos jovens, quando equiparados à população adulta. Existem diferentes padrões de excreção viral, sendo os animais agrupados em 3 categorias distintas: os portadores, os quais excretam continuamente o vírus por longos períodos de tempo, permanecendo infetados toda a vida, os excretores intermitentes, os quais representam a maioria dos animais, e os animais não excretadores. Estes últimos, aparentam ser resistentes à infecção, não demonstrando qualquer excreção viral, e permanecem seronegativos ou com títulos de anticorpos muito baixos (Addie and Jarrett 2001). A excreção fecal tem início 1 semana após infecção e mantém-se a níveis elevados durante um período de 2 a 10 meses (Pedersen et al. 2008). Contrariamente ao que se poderia pensar, apesar de promoverem a manutenção do vírus no ambiente, os portadores não estão mais predispostos ao desenvolvimento de PIF comparativamente a qualquer outro felídeo (Addie and Jarrett 2001).

Os gatos podem eliminar a infecção dentro de 6 a 8 meses, caso não ocorra processo de reinfeção (Pedersen et al. 2008), podendo esta reinfeção ser pela mesma ou uma estirpe diferente do vírus (Kipar and Meli 2014). O processo de eliminação viral tem vindo a ser correlacionado com tipo de resposta imunitária, humoral ou celular, criada contra o vírus (Drechsler et al. 2011). As conclusões gerais de estudos com gatos experimentalmente infetados, indicam que a imunidade humoral não tem um papel importante no processo de prevenção da infecção e disseminação pelo FIPV, podendo ainda contribuir para a patogénese. Em contraste, a imunidade celular contribui de forma essencial no combate contra a infecção pelo FIPV (Pedersen 2009; Drechsler et al. 2011).

A patogénese da PIF tem sido foco de pesquisa por vários investigadores a nível mundial e, apesar de ainda não ser entendida na sua totalidade, foram recentemente identificados alguns pré-requisitos essenciais para a sua ocorrência. Estes pré-requisitos incluem a infecção sistémica por uma estirpe virulenta de FCoV (FIPV), capacidade de replicação efetiva e duradoura deste agente nos monócitos e ativação dos monócitos infetados pelo vírus (Kipar and Meli 2014).

O processo através do qual o vírus adquire o seu tropismo para os macrófagos/monócitos, parece estar associado à ocorrência de mutações do FECV, o qual

perde a seu tropismo original para os enterócitos (Pedersen 2014). Vários estudos foram realizados no sentido de identificar a mutação responsável por esta alteração, sendo que segundo Rottier et al. (2005), esta se localiza na proteína S do FCoV. Por sua vez, Licitra et al. (2013), sugeriu que as mutações identificadas na região S1/S2 do FIPV seriam responsáveis por uma alteração do tipo de proteases capazes de clivar esta região. As referidas mutações poderiam ter como possível consequência a clivagem da proteína S por proteases específicas de macrófagos/monócitos, o que explicaria a mudança de tropismo celular, crucial no desenvolvimento da PIF. As mutações podem ocorrer a nível intestinal, aquando da replicação viral, ou no interior dos monócitos/macrófagos (Pedersen et al. 2012). Contudo, mesmo tendo sido reportado que ambos os biótipos, FECV e FIPV, têm a capacidade de se replicar nos macrófagos e monócitos *in vitro*, apenas o FIPV é capaz de alcançar uma replicação sustentável e disseminar a infeção em cultura de células (Kipar and Meli 2014).

A infeção culmina numa desregulação imunitária, caracterizada por uma profunda depleção das células CD4+ e CD8+, produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) pelos macrófagos infetados, sendo ainda observada hipergamaglobulinémia (Sykes 2013). O mecanismo por detrás da apoptose das células CD4+ e CD8+, e da consequente linfopenia associada, apesar de não estar totalmente esclarecido, parece estar ligado ao papel nefasto que o TNF- α desempenha na PIF (Pedersen 2009).

O TNF- α e o IFN γ têm vindo a demonstrar um papel significativo na imunidade e patogénese associada à infeção pelo FIPV. Animais que desenvolvem doença apresentam níveis elevados de TNF- α e níveis reduzidos de IFN γ , em oposição aos animais saudáveis, cujos valores se apresentam invertidos, estando o valor de IFN γ elevado e o de TNF- α baixo. Em suma, as investigações sugerem que a infeção pelo FIPV reduz a resposta imunitária celular, possivelmente devido ao comprometimento da libertação de IFN γ pelos leucócitos, aumento da libertação de TNF- α pelos monócitos e macrófagos infetados e, subsequente, depleção de células T (Drechsler et al. 2011).

Os monócitos infetados, além de TNF- α , expressam ainda outras citocinas e moléculas de adesão, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e a CD18, respetivamente, as quais permitem a sua interação com as células endoteliais. Existe ainda, a expressão de uma enzima específica, a metaloproteinase-9, cuja função assenta no aumento da permeabilidade da membrana vascular nos locais de ligação aos monócitos. Além disso, foi também observado o aumento da transcrição do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pelos monócitos infetados, levando a um aumento dos níveis séricos do mesmo. Estas interações são, provavelmente, as responsáveis pelo aparecimento de flebitis e periflebitis granulomatosas, que correspondem às lesões iniciais características da PIF

(Kipar and Meli 2014).

Kipar et al. (2006) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a atividade e composição de tecidos hemolinfáticos em gatos naturalmente infetados por FCoV, focando-se particularmente na população de macrófagos e nas citocinas produzidas. Os autores concluíram assim que os gatos infetados por FCoV são capazes de montar uma resposta imunitária efetiva, associada à inibição da ativação excessiva dos macrófagos e aumento da citotoxicidade celular mediada pela IL-10, enquanto a falta de produção de IL-12, nos animais que desenvolvem PIF, poderá ser responsável tanto pela falha da resposta imunitária celular, quanto pela redução da carga viral.

Segundo pesquisas recentes, sabe-se que os animais com PIF, devido à acrescida ativação das células B, apresentam um aumento do número de plasmócitos no sangue periférico e, conseqüentemente, dos níveis de gamaglobulinas (Takano et al. 2009; Malbon et al. 2020). Na maioria das infecções virais, a resposta humoral resulta na formação de anticorpos neutralizantes, os quais são úteis na prevenção da infecção (Drechsler et al. 2011). Todavia, no caso das infecções pelo FIPV, além da imunidade humoral não ser protetora contra o agente, os anticorpos têm vindo a ser associados a dois processos imunitários distintos: o primeiro corresponde a uma reação de hipersensibilidade tipo III (Arthus-type hypersensitivity) centrada nas vénulas; o segundo um processo de aumento da entrada e replicação viral nos macrófagos mediada por anticorpos (Pedersen 2009).

Este tipo de reação de hipersensibilidade é caracterizada por vasculites, edema, migração de células inflamatórias e necrose, e ocorre devido à deposição de imunocomplexos na periferia das vénulas (Pedersen 2009). Contudo, foi reportado que a vasculite típica da PIF não apresenta características semelhantes à vasculite mediada por imunocomplexos, como o envolvimento de artérias e predominância de neutrófilos. As reações de hipersensibilidade tipo III não aparentam assim ser essenciais na patogénese da doença, porém não se pode excluir a sua contribuição para a ocorrência da mesma. Outros autores sugeriram ainda o envolvimento de reações de hipersensibilidade do tipo IV na patogénese da PIF para explicar o desenvolvimento das lesões granulomatosas características (Kipar and Meli 2014).

Existem evidências, em estudos experimentais, de que a presença de anticorpos contra o coronavírus promove a infecção pelo FIPV, sendo que os epítomos responsáveis por este processo parecem residir na proteína S do FCoV (Pedersen 2014). A resposta imune humoral contribui assim para a patogénese da doença, uma vez que os anticorpos para a proteína S, responsável pela adesão viral, facilitam a entrada viral nos macrófagos, através dos receptores Fc dos mesmos (Drechsler et al. 2011). Porém, foi ainda referido que este fenómeno poderá não ter tanta importância na natureza, quanto aquela que apresenta a nível experimental (Pedersen 2009).

Os mecanismos de evasão do vírus ao sistema imunitário têm vindo a ser estudados

ao longo do tempo, tendo sido apontados 2 processos distintos como explicação. Um dos processos parecia estar relacionado com as proteínas virais, cuja expressão à superfície das células infetadas conferia a capacidade de prevenir a lise mediada pelo complemento. Mais tarde, foi reportado outro mecanismo de evasão que se baseava na observação de que essas mesmas proteínas virais expressas à superfície dos monócitos infetados, após ligação aos anticorpos, eram rapidamente internalizadas, escapando assim à lise celular dependente de anticorpo (Pedersen 2014).

Em suma, o desenvolvimento ou não de PIF está dependente não só de fatores relacionados com o vírus, como também da resposta imunitária montada pelo hospedeiro.

3. Apresentação clínica e sinais clínicos

3.1. Sinais clínicos associados à infeção por FECV

A infeção inicial pelo FECV está geralmente associada a quadros de diarreia moderada de intestino delgado, podendo ser aguda ou crónica, persistente ou intermitente. Menos frequentemente, sinais como vômito e/ou inapetência podem também desenvolver-se, sendo ainda comum alguns animais permanecerem assintomáticos (Drechsler et al. 2011, Sykes 2013). Os gatos desenvolvem assim uma enterite, não necessitando na maioria dos casos de tratamento (Drechsler et al. 2011). Contudo, já foram reportados alguns casos de enterite fatal em gatos jovens e adultos após infeção pelo FECV (Kipar and Meli 2014). Além da enterite, estes gatos podem ainda apresentar sinais clínicos de aparelho respiratório superior em fases iniciais da infeção (Greene 2011, Sykes 2013).

3.2. Infeção pelo FIPV

A PIF é tipicamente caracterizada por serosites fibrinosas e granulomatosas, efusões serosas ricas em proteína e/ou lesões piogranulomatosas em diversos órgãos (Kipar and Meli 2014). O piogranuloma consiste numa acumulação de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e, ocasionalmente, plasmócitos que tendem a formar pequenas agregações em torno das vénulas nos tecidos-alvo. Estas lesões estão fortemente associadas a edemas e derrames, por vezes de grandes volumes, sendo o fluido rico em proteínas plasmáticas, produtos de degradação da hemoglobina, proteínas inflamatórias de vários tipos e fatores de coagulação ativados (Pedersen 2014). O processo de vasculite típico da PIF tem distribuição relativamente limitada, apresentando maior afinidade para as veias de pequeno a médio calibre presentes nas leptomeninges, córtex renal e olhos (maioritariamente as vénulas da íris, coróide e retina), sendo menos provável de ocorrer ao nível do pulmão e fígado (Kipar and Meli 2014).

Clinicamente é feita uma distinção entre a forma efusiva (húmida ou não parenquimatosa) e a forma não efusiva (seca ou parenquimatosa) da doença. Todavia,

muitas vezes a forma clínica apresentada não é estável, podendo esta vir a alterar-se ao longo da progressão da doença (Norris et al. 2005), originando assim formas mistas, as quais apresentam características tanto da forma efusiva, como da não efusiva (Kipar and Meli 2014). Gatos que originalmente apresentavam forma seca da doença podem, em fases terminais, desenvolver derrames cavitários, sendo esta conversão para manifestações mais característica da forma efusiva responsável da progressiva falência da resposta imunitária (Norris et al. 2005, Sykes 2013).

O tipo e intensidade da resposta imunitária gerada pelo hospedeiro, contra a infeção pelo FIPV, aparenta determinar a forma clínica que a doença irá assumir (Pedersen 2009). É amplamente aceite que a imunidade, quando ocorre, é maioritariamente do tipo celular e que a produção de anticorpos constitui um processo contraproducente. Assume-se assim, que muitas alterações em casos de PIF sejam associadas à forma como os macrófagos respondem à infeção viral, bem como ao modo como o sistema imunitário do hospedeiro responde às células infetadas. Neste sentido, a forma efusiva resulta da falha imunitária ao montar uma resposta mediada por células T, face a uma resposta vigorosa de células B. No extremo oposto, os gatos resistentes à doença montam uma resposta imune celular vigorosa, capaz de superar qualquer efeito negativo de anticorpos. Os animais com a forma seca da doença apresentam um estado intermédio, envolvendo uma resposta celular, parcialmente eficaz na contenção viral, possuindo um número relativamente pequeno de macrófagos em escassos focos no interior de órgãos-alvo específicos (Pedersen 2014).

A doença pode desenvolver-se em poucas semanas após infeção ou após anos da mesma, mas mais frequentemente ocorre entre 6 a 18 meses após infeção inicial. Mesmo após o início da doença inflamatória sistémica piogranulomatosa, os sinais clínicos podem não ser aparentes por meses (Sykes 2013).

Ambas as formas clínicas apresentam uma vasta gama de sinais clínicos, porém nenhum deles parece ser patognomónico de PIF (Drechsler et al. 2011). A apresentação clínica da doença é assim altamente variável, como reflexo da distribuição das lesões piogranulomatosas e da vasculite (Addie et al. 2009). Os primeiros sinais de PIF, presentes em ambas as formas clínicas, incluem febres flutuantes, não responsivas a antibioterapia ou anti-inflamatorios não esteróides (AINEs), anorexia, perda de peso, atrasos de crescimento, nos mais jovens, e letargia progressiva (Pedersen 2009, Tasker 2018). Contudo, muitos gatos permanecem ativos, com apetite e em boa condição corporal em estados precoces da doença (Sykes 2013). A linfadenomegalia e icterícia são outros dois achados passíveis de serem observados em ambas as formas clínicas, embora a icterícia seja mais comum na forma efusiva da PIF (Tasker 2018). Alguns pacientes podem ainda apresentar um aumento da ingestão de água e da micção, possivelmente secundária à pirexia (Sykes 2013). Existem ainda muitos casos de sinovites generalizadas, seja por deposição de imunocomplexos ou pela migração de monócitos/macrófagos infetados para as sinóvias,

gerando claudicações nos animais afetados (Pedersen 2009). Os restantes sinais clínicos desenvolvem-se mais tardiamente, estando dependentes da forma clínica e distribuição da inflamação (Pedersen 2009).

A forma efusiva tem sido apontada por várias investigadores como a forma clínica mais comum de PIF (Pedersen 2009, Riemer et al. 2016), sendo frequentemente aguda em natureza, progredindo dentro de poucos dias ou semanas (Barker and Tasker 2020). Esta forma é caracterizada por acumulação de exsudados altamente proteicos, os quais tipicamente contêm baixo número de células. Um dos fatores que contribui para o aparecimento destes derrames é a produção de VEGF, pelos monócitos infetados, o qual promove um aumento da permeabilidade vascular (Sykes 2013). Os derrames característicos podem formar-se em apenas uma ou mais cavidades corporais, sendo as manifestações mais frequentes o derrame abdominal e as, consequentes, apresentações clínicas de ascite e distensão abdominal (Barker and Tasker 2020). O abdómen, além de se apresentar bastante distendido, está frequentemente doloroso à palpação e é facilmente detetável a presença de fluido aquando da sua percussão. O fluido é mucinoso de cor amarelada e de aspeto leve a moderadamente turvo (Pedersen 2009). Muitas vezes, as distensões abdominais são de tal ordem que podem mesmo camuflar a perda de peso acentuada que estes pacientes apresentam ao longo da doença (Sykes 2013). Os pacientes com envolvimento torácico podem apresentar sinais de dispneia e taquipneia e, devido ao desenvolvimento de derrame pleural, pode observar-se padrão de respiração rápida e superficial (*shallow breathing*), assim como sons cardíacos e pulmonares abafados à auscultação, durante o exame físico (Sykes 2013). Os animais podem ainda apresentar envolvimento cardíaco, sendo a PIF responsável por aproximadamente 10% dos derrames pericárdicos em gatos (Sykes 2013), estando estes raramente associados a tamponamento cardíaco (Barker and Tasker 2020). Existem ainda alguns achados mais raros reportados em gatos com forma húmida da doença, como a síndrome de fragilidade cutânea (Pedersen 2009) e ainda, distensão escrotal em machos inteiros (Pedersen 2009, Barker and Tasker 2020). Este último achado é resultado da serosite da túnica vaginal e, consequente, edema por extensão do processo de peritonite existente (Pedersen 2009). Por fim, foram também referidas infeções por FIPV *in-utero* em ninhadas de gatas que desenvolveram a forma efusiva da doença durante a gestação, sendo que as principais lesões observadas nos gatinhos incluíam pneumonia, pleurite e hepatite (Pedersen 2009).

A forma seca está frequentemente associada a sinais clínicos inespecíficos e vagos, em particular nas fases iniciais da doença (Barker and Tasker 2020), apresentando geralmente total ausência ou quantidade muito baixa de líquido de derrame (Pedersen 2009). Esta forma é caracterizada por inflamação piogranulomatosa a granulomatosa em vários órgãos, em particular no sistema nervoso central (SNC), olhos e órgãos abdominais, como linfonodos mesentéricos, rins, fígado e trato gastrointestinal (TGI), estando assim o

aparecimento de sinais mais específicos dependente dos órgãos afetados pelas lesões granulomatosas (Sykes 2013, Barker and Tasker 2020). Porém, qualquer tipo de tecido pode ser afetado, já tendo sido descritos casos de envolvimento primário dos pulmões e pele (Barker and Tasker 2020). Os casos de envolvimento pulmonar estão relacionados com o desenvolvimento de pneumonia piogranulomatosa difusa, que se traduz em graves episódios de dispneia nos animais afetados (Addie et al. 2009). Os sinais dermatológicos manifestam-se tipicamente pelo aparecimento de pequenos nódulos ou pápulas múltiplos não pruríticos (Tasker 2018), possivelmente devido ao processo de flebite dermal piogranulomatosa necrótica que se desenvolve (Addie et al. 2009). Sabe-se que o envolvimento ocular e/ou do SNC predomina em cerca de 60% dos animais com forma não efusiva (Pedersen 2009), assim sendo um exame neurológico e ocular cuidadoso destes animais pode revelar alterações que apoiem o diagnóstico de PIF, bem como indicar possíveis fontes de colheita para testagem (Barker and Tasker 2020). Os sinais neurológicos são frequentemente observados na forma não efusiva da doença, estando dependentes, não só dos órgãos envolvidos no processo, mas também da localização exata e gravidade das lesões (Pedersen 2009). Estes sinais resultam primariamente de meningoencefalites, meningomielites, endimites, coroidites e hidrocefalia obstrutiva, sendo este último secundário a endimites e coroidites (Sykes 2013), estando representada na figura 2. Os sinais mais comuns incluem ataxia, por vezes acompanhada de tetraparésias ou paraparésias, hiperestesia, head tilt, nistagmos, convulsões, alterações comportamentais, alterações de estado mental, défice dos nervos cranianos e défice de reações posturais (Barker and Tasker 2020).

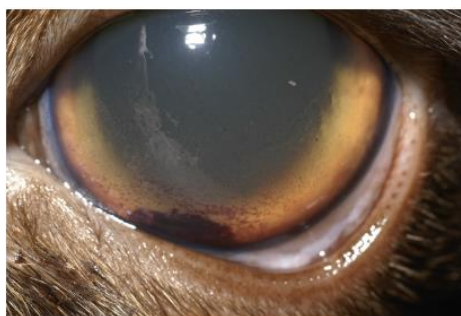


Figura 1. Felídeo de raça Sagrado da Birmânia, macho inteiro de 5 anos com PIF e presença de precipitados queráticos (Sykes 2013).



Figura 2. Hidrocefalia obstrutiva num felídeo macho castrado de 8 meses de idade, de raça Exótico de pelo curto, o qual desenvolveu ataxia e tremores (Sykes 2013).

O envolvimento ocular, à semelhança do SNC, é comum na forma seca da PIF, sendo a uveíte e a corioretinite as suas manifestações oculares predominantes (Pedersen 2009). A uveíte pode estar associada a alterações de coloração da íris, discoria e anisocoria, provavelmente secundárias a processo irite, mas também a perda de visão repentina e hifema (Addie et al. 2009). Esta alteração de coloração da íris é frequentemente

um dos sinais precoces de PIF ocular. Existem lesões focais, similares aos granulomas presentes nos órgãos parenquimatosos, que podem ser observadas na íris, as quais explicam as distorções na forma da pupila, que muitas vezes se observam nesta doença (Pedersen 2009). Os precipitados queráticos constituem outro achado característico da PIF, formados por acumulação de fibrina, macrófagos e outras células inflamatórias (Pedersen 2009), os quais se depositam na zona ventral do endotélio corneal (Addie et al. 2009), como se pode observar na figura 1. No exame oftalmológico, além do referido anteriormente, pode também observar-se a presença de conjuntivite, corrimento ocular mucopurulento, espessamento e hiperémia da membrana nictitante, *flare* do humor aquoso, hipópion, infiltrados perivasculares e descolamento da retina (Sykes 2013). Por fim, a doença ocular presente na PIF seca pode ocorrer solitariamente ou em associação com lesões no SNC e cavidade peritoneal (Pedersen 2009). As lesões abdominais presentes na PIF seca, apesar de aparecerem em menor número, são bastantes mais extensas e disseminadas que as presentes na forma húmida, estendendo-se das superfícies das serosas e pleura para o parênquima subjacente (Pedersen 2009). As lesões mais comuns são frequentemente encontradas nos rins (Pedersen 2009, Kipar and Meli 2014) e linfonodos mesentéricos, sendo menos comuns no fígado e linfonodos hepáticos (Pedersen 2009). A palpação abdominal pode revelar renomegália, com ou sem superfície renal irregular, hepatomegália e/ou massas abdominais resultantes de linfadenomegália dos mesentéricos, por vezes associadas a dor local (Pedersen 2009, Sykes 2013). A PIF seca pode ainda estar associada a envolvimento torácico em cerca de 10% dos animais, com o aparecimento de pequenos granulomas na pleura e parênquima pulmonar subjacente, tendo sido também descrita a possibilidade de envolvimento cardíaco (Pedersen 2009).

Ocasionalmente pode ocorrer uma forma particular de PIF seca, designada PIF focal, a qual tipicamente se apresenta como uma massa abdominal à palpação (Tasker 2018). As lesões associadas são frequentemente encontradas ao nível do colón ou junção ileocecólica, consistindo em granulomas, focais ou multifocais, formados nesta região (Greene 2011, Sykes 2013). Os sinais clínicos resultantes desta forma correspondem tipicamente a sinais de colite ulcerativa, incluindo fezes moles com presença de sangue e muco (Pedersen 2009).

4. Diagnóstico

A PIF permanece até aos dias de hoje uma das doenças mais desafiantes e difíceis de diagnosticar, particularmente em gatos que não apresentam derrames cavitários (Felten and Hartmann 2019). O diagnóstico definitivo é feito apenas através da técnica de imunohistoquímica (IHC) para deteção de antigénio em amostras de lesões piogranulomatosas características desta doença (Sykes 2013). Porém, a impossibilidade de obtenção destas amostras em segurança nos felídeos com PIF, obriga muitas vezes a que o

diagnóstico *ante-mortem* seja feito com base no conjunto da história pregressa, incluindo avaliação de fatores de risco, sinais clínicos e alterações clínicas e laboratoriais (Drechsler et al. 2011). Contudo, nenhuma destas alterações é patognomónica da doença e, como tal, outros diagnósticos diferenciais comuns devem ser tomados em consideração na investigação clínica (Barker and Tasker 2020).

4.1. Diagnósticos diferenciais

A PIF apresenta alguns diagnósticos diferenciais comuns, entre os quais se encontram as infeções por retrovírus (FIV/FelV), toxoplasmose, colangite linfocítica, pancreatite, peritonite séptica, piotórax, insuficiência cardíaca congestiva e neoplasias, como linfoma (Barker and Tasker 2020).

4.2. Hematologia e bioquímicas séricas

As alterações hematológicas encontradas na PIF, apesar de não serem específicas, podem ajudar a sustentar o diagnóstico da doença (Tasker 2018). Os hemogramas destes felídeos frequentemente demonstram alterações graves, as quais tendem a ser similares, independentemente da forma clínica da doença apresentada (Pedersen 2009). A linfopenia é particularmente comum, por vezes acompanhada de neutrofilia com desvio à esquerda e trombocitopenia (Felten and Hartmann 2019), podendo esta última refletir a presença de coagulação intravascular disseminada (CID) ou destruição plaquetária imunomediada (Sykes 2013). Segundo uma pesquisa recente, a linfopenia constituiu a alteração hematológica mais comum em ambas as formas clínicas de PIF, apesar de ter sido mais frequentemente documentada em animais com efusões (Riemer et al. 2016). Nestes pacientes pode ainda observar-se anemia não regenerativa (normocítica e normocromica), à semelhança do que ocorre em outros felídeos com doença crónica (Drechsler et al. 2011), tendo sido referidos casos de microcitose, com ou sem associação a anemia (Riemer et al. 2016, Tasker 2018). A pesquisa de Norris et al. (2005) referiu ainda a ocorrência de casos de anemia hemolítica imunomediada em felídeos com PIF, apesar de constituir um achado extremamente incomum.

A grande maioria dos gatos com PIF apresenta também alterações nos valores referentes às bioquímicas séricas. Algumas destas alterações incluem a hiperproteïnemia, em especial a hiperglobulinémia, a qual pode ocorrer sem que haja aumento das proteínas séricas totais, a hipoalbuminémia e hiperbilirrubinémia, ambas mais frequentemente observadas em gatos com efusões, e potencialmente azotémia e aumento das enzimas hepáticas, dependendo do órgão afetado (Felten and Hartmann 2019). A alteração mais frequentemente encontrada nos gatos com PIF corresponde a uma gamopatia policlonal, apesar de já terem sido reportadas gamopatias monoclonais num escasso número de animais (Barker and Tasker 2020). A hiperproteïnemia pode não estar presente em alguns

felídeos, visto que muitas vezes a hiperglobulinemia aparece associada a valores de albumina perto do limite inferior de referência ou mesmo abaixo deste (Tasker 2018). Por outro lado, sabe-se que a concentração de globulinas séricas pode decrescer em fases terminais da doença, podendo as concentrações de proteínas totais encontrar-se dentro dos intervalos de referência nestes animais (Sykes 2013). A hipoalbuminemia na PIF é frequente devido ao envolvimento hepático, ao extravasamento a partir dos vasos lesionados, a proteinúria em gatos com glomerulonefrite e/ou pelo facto de ser uma proteína de fase aguda negativa (Sykes 2013), contribuindo assim para a redução do rácio albumina:globulina (A:G). Este último parâmetro é bastante mais útil para apoiar o diagnóstico de PIF, que as próprias concentrações de gama-globulina ou proteínas séricas totais, tendo sido sugeridos vários *cut-offs* para incluir (<0,4) ou excluir (>0,6-0,8) a PIF da lista de diferenciais (Felten and Hartmann 2019). Os rácios A:G reduzidos são assim fortemente associados a doença, porém deve proceder-se a exclusão de outras causas de hiperglobulinemia (Drechsler et al. 2011).

4.2.1. Medição da concentração de proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda são produzidas no fígado em resposta a citocinas libertadas por macrófagos ativados e monócitos (Barker and Tasker 2020).

A α 1- glicoproteína ácida (AGP) representa uma destas proteínas de fase aguda, cuja medição pode ser útil para dar suporte ao diagnóstico de PIF. Apesar das elevações de AGP (>0,48 mg/ml) não serem específicas para a doença por si, aumentos marcados dos níveis de AGP (>1,5 mg/ml) são frequentemente encontrados em casos de PIF (Tasker 2018). Destacaram-se ainda outras duas proteínas de fase aguda, a amilóide sérica A e a haptoglobina, as quais poderiam contribuir para o diagnóstico da doença, apesar de ambas demonstrarem menor sensibilidade e especificidade que a AGP (Barker and Tasker 2020).

Todavia, as concentrações elevadas destas proteínas são também observadas em felídeos com outras doenças inflamatórias, neoplásicas e até em gatos saudáveis infetados por FECV, não sendo assim patognomónicas de PIF (Felten and Hartmann 2019).

4.3. Urinálise

Os felídeos com lesões glomerulares ou tubulares podem apresentar proteinúria, podendo também ser observada hematuria e, mais raramente, piúria e cilindrúria. Em gatos com envolvimento hepático pode verificar-se bilirrubinúria, sendo que em alguns animais as análises podem não apresentar qualquer alteração (Sykes 2013).

4.4. Análise de líquido de derrame

As análises de qualquer derrame obtido a partir de um caso suspeito de PIF são extremamente úteis para o diagnóstico, razão pela qual a colheita destas amostras deve ser

sempre considerada uma prioridade nestes animais (Tasker 2018). A maioria dos felídeos com PIF apresenta líquidos de derrame, cujo fluido é tipicamente viscoso, cor de palha, translúcido a moderadamente turvo, formando usualmente coágulos devido ao elevado conteúdo proteico (Felten and Hartmann 2019), sendo caracterizado como um transudado modificado ou exsudado piogranulomatoso não séptico (Drechsler et al. 2011). Estes fluidos assumem normalmente teores proteicos acima de 3,5g/dL e baixas contagens celulares (< 5000 células/ μ L), correspondendo, estas últimas, a macrófagos, neutrófilos não degenerados e alguns linfócitos, os quais podem ser observados aquando do exame citológico (Sykes 2013, Barker and Tasker 2020).

Os derrames típicos de PIF, além de possuírem elevado conteúdo proteico e baixas contagens celulares, apresentam ainda baixo valor de rácio A:G (Felten and Hartmann 2019). Segundo alguns autores, valores de rácio inferiores a 0,4 são considerados muito sugestivos de doença (Sykes 2013), porém estas alterações podem também ocorrer em derrames de outras etiologias (Felten and Hartmann 2019).

O teste de Rivalta constitui um teste rápido e pouco dispendioso, o qual pode ser facilmente executado na prática clínica, devendo, por estes motivos, ser incluído no protocolo de diagnóstico de gatos com derrames cavitários. Este teste apresenta uma boa sensibilidade para a exclusão de PIF, no entanto um resultado positivo deve-se frequentemente a teores de proteínas e mediadores inflamatórios elevados no fluido analisado, o que pode ser observado em outras afeções, não sendo assim específico para a PIF (Felten and Hartmann 2019).

4.5. Análise do líquido cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é frequentemente colhido após diagnóstico por imagem do SNC, sendo a sintomatologia neurológica mais comum em felídeos com PIF seca (Felten and Hartmann 2019). Este líquido apresenta tendencialmente um conteúdo proteico elevado (30-1000 mg/dL, para um limite de referência inferior a 25 mg/dL) e um aumento da contagem de células nucleadas totais (20-10000 células/ μ L), correspondendo normalmente a um misto celular com predominância de pleocitose neutrofílica (Sykes 2013). Todavia, deve ser tido em conta o fato de que estas alterações podem estar presentes em gatos com outras doenças neurológicas, assim como gatos que apresentem sinais neurológicos provocados por PIF podem demonstrar análises de LCR normais (Felten and Hartmann 2019).

4.6. Análise do humor aquoso

O envolvimento ocular na PIF inclui processos de uveíte e coriorretinite com ocorrência de infiltrados celulares inflamatórios mistos, nos quais predominam os linfócitos B e plasmócitos. A aquacentese do humor aquoso pode assim fornecer amostras para

execução de exames citológicos e clinicopatológicos nestes felídeos, apesar de muitas vezes não permitir atingir o diagnóstico final, sendo mais útil em outras doenças (Felten and Hartmann 2019).

4.7. Imagiologia

O diagnóstico por imagem pode ser útil na PIF, não só para identificar as diversas lesões presentes, mas também para auxiliar na colheita de amostras das mesmas, as quais são essenciais à execução de outros testes de diagnóstico complementar (Barker and Tasker 2020).

As radiografias torácicas simples podem revelar a presença de derrame pleural, aumento da silhueta cardíaca e infiltrados nodulares peribronquicos, em pacientes com derrame pericárdico e pneumonia piogranulomatosa. Relativamente à radiografia abdominal os achados encontrados incluem perda de detalhe peritoneal e do espaço retroperitoneal, em animais com derrames, e ainda hepatomegalia, esplenomegalia, renomegalia, linfadenomegalia e massas associadas ao TGI (Sykes 2013).

A ultrassonografia é útil para o diagnóstico de PIF, permitindo a obtenção de amostras de tecidos e fluidos nestes animais com recurso a técnicas minimamente invasivas, como são exemplo a toracocentese, abdominocentese e punção aspirativa com agulha fina (PAAF) ecoguiada (Barker and Tasker 2020). Os achados ecográficos abdominais incluem presença de fluido peritoneal anecogénico, hiperecogenicidade mesentérica e ainda linfadenomegalia e hipocogenicidade dos linfonodos abdominais (Sykes 2013). A nível renal podem ainda estar presentes achados como assimetria renal, hiperecogenicidade da cortical, acumulação de fluido subcapsular e perda de transição cortico-medular (Sykes 2013). Recentemente foi também sugerida uma associação entre a presença de sinal de margem medular e a PIF, constituindo este achado um suporte ao diagnóstico em casos suspeitos da doença (Ferreira et al. 2020). Relativamente aos restantes órgãos da cavidade abdominal, pode ser observada organomegalia e áreas de hipocogenicidade no fígado e baço, mas também espessamento da parede intestinal ou massas intestinais (Sykes 2013).

Nos felídeos que apresentam sinais clínicos neurológicos de PIF, a imagiologia, nomeadamente a ressonância magnética, pode tornar-se útil para identificar as alterações presentes SNC (Tasker 2018). Os achados imagiológicos presentes nestes animais consistem na dilatação ventricular, devido a hidrocefalia, hérnia do forâmen magno, aumento variável do contraste das regiões periventriculares, coróides e meníngeas, entre outros (Crawford et al. 2017, Tasker 2018), porém existem gatos que não apresentam qualquer alteração (Sykes 2013, Crawford et al. 2017).

4.8. Serologia

A serologia, baseada na detecção de títulos de anticorpos de FCoV por diversas metodologias, é amplamente utilizada para assistir o diagnóstico de PIF (Kipar and Meli 2014). Os métodos utilizados atualmente incluem testes de imunofluorescência indireta, testes de neutralização viral, testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes de imunocromatografia, sendo que podem utilizar quer o FCoV, quer o TGEV como antígeno no substrato (Felten and Hartmann 2019). Contudo, apesar da existência dos diversos testes, nenhum deles tem a capacidade de conferir um diagnóstico definitivo de PIF, visto não fazerem distinção entre as infecções pelo FECV e as infecções pelo FIPV (Drechsler et al. 2011). Posto isto, a obtenção de um resultado positivo num destes testes indica apenas que o animal sofreu infecção por FCoV e seroconversão, a qual ocorre normalmente após 2 a 3 semanas da infecção inicial (Tasker 2018).

Sabe-se que animais com PIF apresentam geralmente títulos de anticorpos mais elevados, quando comparados com animais sem a doença (Tasker 2018), sendo títulos superiores a 1:400 considerados suspeitos de PIF (Norris et al. 2005). Porém, já foram reportados falsos negativos em alguns gatos doentes (Kipar and Meli 2014). Uma das razões para esta situação é o facto de existir grande quantidade de vírus presente o qual se liga aos anticorpos, impedindo-os de estar disponíveis para a detecção. Por outro lado, em animais com efusões ocorre perda de proteína, devido ao processo de vasculite, contribuindo assim para a falha na detecção destes anticorpos (Drechsler et al. 2011, Felten and Hartmann 2019). Reportou-se também que gatos em fases terminais de doença podem ser seronegativos, visto existir falha na produção de anticorpos decorrente da imunossupressão característica da PIF (Sykes 2013), podendo atingir aproximadamente 10% da população (Felten and Hartmann 2019). Em adição, foram também registados alguns falsos positivos no decorrer destes testes, os quais se atribuíram a certos acontecimentos como vacinação recente, utilização de fármacos, como o tiamazol e metimazol, ou ainda infecções concomitantes pelo FIV e doenças auto-imunes (Drechsler et al. 2011).

Os testes para detecção de anticorpos podem ser realizados em amostras de sangue, líquido de derrame e LCR, sendo neste último, muitas vezes, difícil obter a quantidade de amostra suficiente para a análise (Sykes 2013). Segundo uma pesquisa recente, a detecção anticorpos no soro ou plasma não é conclusiva de PIF, no entanto a sua medição pode ser útil na elaboração de medidas preventivas e controlo de FCoV em ambientes com múltiplos gatos (Felten and Hartmann 2019). Relativamente à detecção de anticorpos em amostras de líquido de derrame e LCR, à semelhança do referido para as amostras de sangue, apresentam também valor de diagnóstico para a doença limitado (Felten and Hartmann 2019).

4.9. Detecção de RNA de FCoV por reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real

A técnica de RT-PCR é frequentemente utilizada para diagnóstico de PIF, procedendo à amplificação de RNA do FCoV em diferentes materiais (Felten and Hartmann 2019), podendo estas amostras incluir tecidos, líquido de derrame, sangue, LCR e humor aquoso em casos suspeitos de doença (Tasker 2018). A presença de RNA viral nestas amostras é assim sugestiva de PIF, no entanto não é capaz de fornecer diagnóstico definitivo (Tasker 2018), uma vez que animais sem a doença podem também apresentar resultado positivo para a presença RNA viral no sangue e tecidos (Sykes 2013), como resultado da disseminação sistémica do FECV. Contudo, sabe-se que animais com PIF apresentam cargas virais bastantes mais elevadas quando comparados com felídeos saudáveis infetados pelo FECV (Felten and Hartmann 2019).

Existem fatores capazes de influenciar a eficácia desta análise como a baixa carga viral presente na amostra, a degradação do RNA viral (Sykes 2013) ou a presença de mutações no local de ligação dos primers (Tasker 2018), podendo resultar no aparecimento de falsos negativos. A amostra de sangue, apesar de poder ser utilizada para esta análise, não constitui uma amostra ideal pelo facto de muitas vezes apresentar baixas cargas virais, contribuindo assim para a redução da sensibilidade do teste (Felten and Hartmann 2019). A RT-PCR pode ainda ser realizada em amostras fecais para identificar os gatos em excreção viral, com o propósito de controlar a infeção viral em ambientes com múltiplos animais e não para o diagnóstico de PIF (Drechsler et al. 2011, Tasker 2018).

Adicionalmente, podem ainda ser aplicadas técnicas moleculares complementares à RT-PCR, como a pirosequenciação, sequenciação de sanger e PCR com sondas de hidrólise, as quais são capazes de caracterizar secções específicas da sequência genómica do FCoV (Tasker 2018). Este agente, à semelhança de outros vírus de RNA, é propenso à ocorrência de mutações, devido a erros decorrentes do processo de replicação, tendo sido algumas destas mutações associadas ao aparecimento do biótipo FIPV, constituindo assim um elemento-chave na patogénese da PIF (Felten and Hartmann 2019). A análise das mutações presente no gene da proteína S aparece como a mais frequentemente utilizada para este propósito, sendo a técnica de pirosequenciação considerada como altamente sensível (Barker and Tasker 2020).

4.10. Detecção de antígeno de FCoV por imunocoloração

Os testes de imunocoloração são executados em tecidos fixados em formalina utilizando a técnica de IHC, ou em amostras citológicas (tipicamente de efusões) utilizando as técnicas de imunocitoquímica (ICC) ou imunofluorescência (IF). Estas técnicas exploram a ligação existente entre os anticorpos e os antígenos de FCoV presentes nas células hospedeiras, a qual pode ser observada através de reações enzimáticas, que produzem

alteração de cor, ou por fluorescência (Tasker 2018).

A IHC para detecção de antígeno de FCoV no interior de lesões histopatológicas características permanece como técnica *gold standard* para o diagnóstico de PIF, apresentando sensibilidade e especificidade elevadas. Contudo, em muitos casos apenas pode ser realizada *post-mortem*, visto a colheita de amostras por laparotomia ou laparoscopia apresentar vários riscos para os doentes, sendo necessário colher amostras de vários órgãos devido à distribuição variável do antígeno no interior das lesões tecidulares (Felten and Hartmann 2019). Existe ainda a possibilidade de obtenção destas amostras através de técnicas menos invasivas, como a PAAF ecoguiada ou as biópsias Tru-cut, no entanto ambas apresentaram baixa sensibilidade (Kipar and Meli 2014, Felten and Hartmann 2019). A detecção de antígeno viral no interior dos macrófagos presentes no líquido de derrame constitui uma ferramenta não invasiva alternativa para a obtenção do diagnóstico de PIF *ante-mortem*, sendo um resultado positivo altamente sugestivo de PIF (Kipar and Meli 2014). Contudo, foram registados alguns falsos positivos, possivelmente devido à ligação do anticorpo a outra estrutura celular não específica no interior dos macrófagos ou à disseminação sistémica e subsequente detecção de FECV em gatos sem PIF (Felten and Hartmann 2019). Além disso, recentemente foi ainda sugerida a utilização de LCR e humor aquoso para detecção de antígeno viral, apresentando sensibilidades na ordem dos 85 a 91 % e 82%, respetivamente (Felten and Hartmann 2019). Todavia, estas técnicas apresentam limitações, tendo sido reportados alguns falsos negativos associados a número insuficiente de células infetadas, baixa carga viral ou indisponibilidade de antígeno para detecção, por este se encontrar retido em complexos imunes (Sykes 2013).

4.11. Necrópsia e Histopatologia

Os achados macroscópicos de necrópsia em gatos com PIF podem incluir quantidades variáveis de líquido de derrame pleural, peritoneal e/ ou pericárdico (Sykes 2013), observando-se por vezes adesões de fibrina à superfície dos diferentes órgãos abdominais e mesentério (HORHOGEA et al. 2011). Os órgãos abdominais, por sua vez, podem apresentar-se aumentados de tamanho e irregulares, existindo por vezes espessamento focal ou difuso da parede intestinal ou massas intestinais, sendo ainda comum achados como a linfadenomegalia abdominal e torácica (Sykes 2013).

A principal lesão desta doença é o piogranuloma, sendo que, na forma efusiva, por vezes toda a cavidade abdominal, torácica ou ambas podem encontrar-se cobertas por pequenas placas esbranquiçadas de 1 a 2 milímetros (Greene 2011). Os granulomas podem também surgir como lesões nodulares multifocais de tamanho variável na superfície das serosas e no interior do parênquima de vários órgãos como o pulmão, baço, rins, pâncreas e fígado (Sykes 2013). Na forma seca, na qual os derrames são mínimos a não detetáveis, a reação inflamatória pode ser restrita a órgãos individuais como o cérebro, olhos ou rins

(Drechsler et al. 2011), sendo estes últimos frequentemente afetados, devendo proceder-se a um exame cuidadoso para a detecção de piogranulomas no córtex (Greene 2011). A nível ocular, as manifestações macroscópicas englobam dilatação e descoloração da íris, bem como os precipitados queráticos usualmente observados nesta doença (Pedersen 2009). O exame do SNC pode revelar um exsudado fibrinoso em associação com as meninges, com ou sem a presença de dilatação ventricular e hidrocefalia (Sykes 2013). Contudo, existem alguns animais nos quais as alterações são mínimas e o diagnóstico é apenas conseguido através do exame histológico.

A lesão característica de PIF consiste numa inflamação granulomatosa a piogranulomatosa perivascular e vasculite (Drechsler et al. 2011), a qual contém predominantemente macrófagos, neutrófilos e, em menor número, linfócitos e plasmócitos (Sykes 2013). Os vasos afetados são predominantemente veias de pequeno e médio calibre, nas quais ocasionalmente ocorre extensão do infiltrado perivascular, dominado por macrófagos, às paredes dos vasos, produzindo áreas focais de necrose e hiperplasia esporádica do músculo liso (Drechsler et al. 2011). A nível ocular as lesões reportadas são uveítes granulomatosas anteriores bilaterais, frequentemente acompanhadas de coriorretinites (Drechsler et al. 2011), correspondendo o infiltrado linfocítico e plasmocítico da úvea anterior à característica morfológica mais comum (Pedersen 2009). Adicionalmente, a nível histológico os precipitados são maioritariamente constituídos por macrófagos, outras células inflamatórias e fibrina (Pedersen 2009). As lesões relativas ao SNC incluem meningoencefalomielite e coroidite piogranulomatosa (Sykes 2013), com ou sem a vasculite como lesão inflamatória distintiva (Drechsler et al. 2011). As lesões de SNC são assim centradas nas meninges e epêndima, podendo também estender-se ao cérebro, medula espinal e nervos subjacentes (Pedersen 2009). Finalmente, a nível intestinal os achados histológicos encontrados incluem descamação do epitélio intestinal, podendo ocorrer atrofia das vilosidades ou mesmo fusão destas (Greene 2011).

5. Tratamento

A obtenção do diagnóstico definitivo de PIF, bem como a exclusão dos possíveis diagnósticos diferenciais para a doença, constituem etapas a serem consideradas antes do início da terapêutica, porém na prática clínica tal nem sempre é exequível, instituindo-se o tratamento quando existe uma forte suspeita da doença (Barker and Tasker 2020).

A PIF é uma doença progressiva e invariavelmente fatal, sendo o prognóstico dos animais afetados frequentemente reservado (Sykes 2013). Atualmente, não está disponível nenhum fármaco licenciado capaz de promover a cura destes felídeos (Barker and Tasker 2020), sendo assim o principal objetivo da terapêutica o prolongamento do tempo e qualidade de vida, através da redução da inflamação e tratamento de suporte (Sykes 2013).

A terapêutica de suporte nestes casos assenta na correção da desidratação e

desequilíbrios eletrólíticos, através de fluidoterapia adequada, e suporte nutricional. A remoção de fluido em pacientes com derrames cavitários tem sido debatida, estando a toracocentese indicada em casos de dispneia. A abdominocentese é considerada controversa, podendo exacerbar a desidratação nestes animais, apesar de alguns autores defenderem a drenagem do fluido seguida da administração intracavitária de corticoesteroides (Barker and Tasker 2020).

Existem 3 principais abordagens no tratamento da PIF, as quais podem ser utilizadas individualmente ou em combinação. A primeira consiste no uso de imunomoduladores inespecíficos, com o propósito de reduzir os efeitos clínicos provocados pelo vírus, a segunda recorre à utilização de fármacos imunossupressores, a fim de reduzir a inflamação que assume um papel central na patogénese da doença, e finalmente uma terceira abordagem baseada na utilização de fármacos antivirais, capazes de inibir a replicação viral (Izes et al. 2020).

Os imunomoduladores não específicos têm vindo a ser utilizados durante anos no tratamento de PIF, tendo como principal propósito a produção de uma resposta imune forte o suficiente para reduzir a carga viral significativamente e consequentemente os efeitos clínicos da infeção. A proteína A do *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, poliprenil e imunomoduladores de linfócitos T, como interferão ómega (IFN- ω), constituem alguns exemplos utilizados, porém todos estes agentes demonstraram limitações ou mesmo ineficácia no tratamento da doença (Izes et al. 2020).

O controlo dos sinais clínicos é assim frequentemente conseguido através da utilização de terapêuticas imunossupressoras, muitas vezes por falta de alternativas mais eficazes e seguras (Izes et al. 2020). Os corticosteróides constituem um dos imunossupressores mais utilizados no tratamento da PIF, sendo benéficos em alguns felídeos, particularmente em termos de qualidade de vida (Barker and Tasker 2020). A administração de prednisolona foi reportada como um dos tratamentos mais eficientes, resultando em remissões temporárias em alguns gatos (Sykes 2013). Contudo, o tratamento com imunossupressores como a prednisolona ou dexametasona não assume um caráter curativo, podendo contribuir apenas para retardar a progressão da doença (Drechsler et al. 2011). A pentoxifilina e propentofilina, bem como a ciclofosfamida e clorambucil representam agentes imunossupressores também utilizados no tratamento de PIF (Izes et al. 2020). A pentoxifilina tem sido utilizada para o controlo da vasculite, bem como a propentofilina (Barker and Tasker 2020), no entanto, segundo a pesquisa de Fischer et al. (2011), esta última não demonstrou qualquer benefício relativo à qualidade de vida, tempo de sobrevivência ou parâmetro clínico e laboratorial nestes pacientes. A ciclofosfamida e a ciclosporina A têm também sido administradas no tratamento da doença a fim de prolongar o tempo de sobrevivência destes felídeos, apesar de não existirem estudos controlados que suportem esta utilização (Barker and Tasker 2020).

Sabe-se que a ciclosporina é capaz de inibir a replicação do FIPV *in vitro*, porém, à semelhança do clorambucil, são necessários mais estudos para determinar se a sua utilização traz benefícios à terapêutica ou, por outro lado, contribui para o agravamento da imunossupressão nestes pacientes (Sykes 2013). Existem ainda outros fármacos, com características antivirais, reportados para o tratamento da PIF, além da ciclosporina, como é o caso do itraconazol e da hidroxicloroquina. Esta última foi alvo de uma pesquisa recente (Takano et al. 2020), na qual demonstrou ser uma alternativa segura e efetiva no tratamento da PIF, sendo a sua atividade antiviral potenciada quando utilizada em combinação com o IFN- ω felino. A sua ação antiviral é conseguida por dois mecanismos distintos: o primeiro, interfere no processo de ligação das partículas virais ao seu recetor de superfície nas células-alvo; o segundo, interfere no processo de entrada viral nas células-alvo mediado por endossomas dependentes de pH (Das et al. 2021). Recentemente foi também realizada uma investigação sobre os efeitos terapêuticos do itraconazol em combinação com a utilização de anticorpos anti-TNF α no tratamento da PIF em felídeos com infeção experimental (Doki et al. 2020). Os resultados desta pesquisa sugerem fortemente a eficácia destes dois agentes no tratamento da doença, tendo-se observado melhoras do quadro clínico dos felídeos em tratamento após 1 a 2 semanas do início da terapêutica. O itraconazol é um agente pertencente ao grupo dos antifúngicos, podendo estar associado a hepatotoxicidade. Os felídeos em tratamento revelaram aumento dos níveis dos marcadores de função hepática e icterícia no decorrer da terapêutica, retornando estes parâmetros ao normal aquando do término da mesma, levando assim os autores a considerarem o itraconazol como seguro do ponto de vista de efeitos adversos (Doki et al. 2020).

As terapêuticas com recurso a interferões são amplamente utilizadas, com base nos seus alegados efeitos benéficos no tratamento de PIF (Barker and Tasker 2020). O interferão ómega constitui uma glicoproteína monomérica produzida pelos leucócitos aquando da infeção viral, a qual possui propriedades antivirais e imunomoduladoras, sendo mais eficaz quando administrado no local da infeção ou via subcutânea (Addie 2008).

Atualmente, o IFN- ω felino constitui uma das opções terapêuticas em felídeos infetados pelo FIPV (Drechsler et al. 2011), tendo-se observado remissões prolongadas em felídeos tratados com interferão recombinante felino em combinação com a administração de glucocorticóides num estudo recente (Ishida et al. 2004). Contudo este estudo apresentou algumas limitações a considerar, nomeadamente a falta de grupos controlo e de confirmação de PIF em alguns dos felídeos incluídos. Uma outra pesquisa investigou o possível papel do IFN- ω felino no tempo de sobrevivência e qualidade de vida em gatos com PIF, no entanto os autores não observaram diferenças estatisticamente significativas no tempo de sobrevivência dos felídeos em tratamento quando comparados com os felídeos pertencentes ao grupo placebo (Ritz et al. 2007).

5.1. Tratamentos futuros

Recentemente têm vindo a ser estudadas novas moléculas com propriedades antivirais, como a GS-441524 e a GC376, que demonstraram resultados promissores no tratamento de PIF. Ambos os agentes interferem com o processo de replicação viral, um através do término do processo de transcrição do RNA viral e o outro ao bloquear a clivagem da poliproteína viral (Pedersen et al. 2019).

A GC376 constitui assim um inibidor de protéase do tipo 3C, a qual demonstrou ser eficaz na redução da replicação viral e na remissão da sintomatologia de PIF em felídeos com infeção natural (Pedersen et al. 2018). Segundo uma pesquisa recente, 19 dos 20 felídeos analisados apresentaram remissão significativa dos sinais clínicos e regressão das lesões, sendo que 7 destes felídeos atingiram remissões por períodos iguais ou superiores a 3 meses após 12 semanas de tratamento (Pedersen et al. 2018). Os autores deste estudo identificaram alguns efeitos adversos associados a esta terapêutica, incluindo atraso no desenvolvimento da dentição definitiva, retenção ou atraso da queda dos dentes decíduos, em gatos jovens, e ainda reações inflamatórias no local da injeção.

A GS-441524 foi também alvo de uma pesquisa recente, a qual incluiu 31 felídeos, dos quais 26 completaram as 12 semanas de tratamento, tendo os restantes 5 falecido ou sido submetidos a eutanásia. Destes 26 felídeos, 8 recidivaram tendo sido necessário iniciar um novo protocolo terapêutico, razão pela qual apenas alcançaram a remissão após a conclusão do mesmo (Pedersen et al. 2019). Relativamente aos efeitos adversos, à semelhança da GC376, também a GS-441524 induziu reações inflamatórias no local de injeção. Os autores desta pesquisa verificaram que a resposta positiva ao tratamento foi independente da raça, idade e forma clínica apresentada pelos felídeos em estudo, contrariamente ao observado para a GC376, para a qual as remissões demonstraram ser mais prováveis de ocorrer em gatos mais jovens e com forma efusiva da doença (Pedersen et al. 2018, Pedersen et al. 2019).

Infelizmente, tanto a GS-441524 como a GC376 apresentam limitações quanto à penetração das barreiras hematoencefálica e hemato-ocular, aumentando assim a probabilidade de recidivas com envolvimento do SNC ou falha na resposta ao tratamento inicial em gatos com sinais neurológicos e oculares de PIF (Barker and Tasker 2020). Contudo, a pesquisa de Pedersen et al. (2019), verificou a ocorrência de maior número de recidivas de origem neurológica e menor resposta a novo tratamento, com dose mais elevada, em felídeos tratados com a GC376, comparativamente ao tratamento com a GS-441524.

6. Prognóstico

A PIF apresenta um prognóstico geralmente muito reservado, sendo que felídeos com forma húmida podem sobreviver dias a semanas, enquanto felídeos com forma seca

podem apresentar sobrevivências ligeiramente superiores, entre semanas a meses (Sykes 2013, Barker and Tasker 2020). Fatores associados a mau prognóstico incluem hiperbilirrubinemia, a presença de derrames cavitários e linfopenia (Sykes 2013). Existem alguns estudos que descrevem sobrevivências na ordem dos 3 a 200 dias (Ritz et al. 2007), tendo sido sugerido por uma pesquisa recente que as formas mistas possam apresentar maior sobrevivência comparativamente às formas seca e efusiva, apresentando um intervalo de sobrevivência de 7 a 477 dias (Tsai et al. 2011). Ocasionalmente, alguns gatos podem sobreviver meses a anos com recurso a tratamento, não sendo clara a influencia que esta terapêutica apresenta sobre a sobrevivência dos mesmos (Barker and Tasker 2020). Contudo, eventualmente todos estes animais acabam por falecer, devendo a eutanásia ser recomendada quando existe degradação da qualidade de vida (Drechsler et al. 2011).

7. Prevenção

A forma mais eficaz de evitar o desenvolvimento de PIF é prevenir a infeção dos felídeos pelo FCoV (Addie 2019). A limpeza e desinfecção das instalações assumem um papel crucial na redução da carga viral ambiental, visto que este agente sobrevive até 7 semanas em ambiente seco e é transmitido essencialmente via fecal e através de fomites (Drechsler et al. 2011, Barker and Tasker 2020). Além disso, devem ainda adoptar-se outras medidas como a colocação de número suficiente de caixas de areia, disponibilizando a comida e água longe das mesmas (Barker and Tasker 2020). Atualmente, alguns substratos têm demonstrado melhores capacidades em neutralizar o FCoV *in vitro* (Addie et al. 2020), devendo estes ser escolhidos em detrimento de outras areias comuns.

Existem ainda fatores que devem ser monitorizados como o stress e a sobrepopulação a que os animais estão sujeitos (Barker and Tasker 2020), bem como as possíveis infeções por outros agentes, como FIV e FeLV (Drechsler et al. 2011), os quais podem predispor estes gatos ao desenvolvimento de doença. O isolamento dos gatinhos com 3 a 4 semanas pode ser útil para evitar a exposição viral (Drechsler et al. 2011). Contudo, os criadores devem evitar o cruzamento de animais que tenham resultado em casos de PIF em múltiplas ninhadas, podendo existir um aumento do risco genético de aparecimento da doença (Barker and Tasker 2020).

Existe ainda a possibilidade de vacinação para a PIF em alguns países, no entanto esta vacina está apenas recomendada para animais com idade igual ou superior a 16 semanas. Esta situação constitui uma limitação à utilização da vacina, visto que a maioria dos felídeos adquire infeção aquando do declínio dos anticorpos maternos, por volta das 5 a 7 semanas (Addie 2019). Além disso, foi ainda reportado que em felídeos seropositivos para o FCoV a administração da vacina não se mostrou benéfica (Barker and Tasker 2020).

Capítulo II: Peritonite Infeciosa Felina, correlação entre formas clínicas e detecção de mutações virais

8. Objetivos

O presente estudo tem como objetivos: (1) a caracterização do quadro clínico das diferentes formas clínicas de PIF; (2) a identificação da possível associação entre a mutação detetada por PCR de transcriptase reversa (RT-PCR) em tempo real com pirosequenciação e a forma clínica apresentada (efusiva, seca ou mista); (3) a análise de sobrevivência à doença da população-alvo.

9. Materiais

9.1. Tipo de estudo, critérios de inclusão e população-alvo

Foi realizado um estudo retrospectivo em felídeos com quadro clínico compatível com PIF e confirmação laboratorial de Peritonite Infeciosa Felina (PIF), internados na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), no período compreendido entre outubro de 2013 e junho de 2021.

No presente estudo, a população de felinos internada na UICB neste período foi constituída por 939 felídeos, dos quais 76 foram internados por suspeita de infeção por FCoV, sendo que 45 destes obtiveram confirmação da infeção posteriormente.

Os critérios de inclusão aplicados consistiu na existência de diagnóstico molecular positivo para Coronavírus Felino e testagem para retrovírus, visto estes serem agentes capazes de provocar quadros clínicos semelhantes e apresentarem uma maior prevalência na população portuguesa (Studer et al. 2019). Vinte e três gatos cumpriram estes critérios, sendo assim incluídos na população-alvo e analisados na presente investigação.

10. Métodos

10.1. Métodos de diagnóstico

O diagnóstico definitivo de infeção por FCoV para o presente estudo, consiste na execução de RT-PCR em tempo real simples, realizado no Laboratório de Virologia e Imunologia da FMV-UL, ou com recurso à técnica de pirosequenciação para deteção de mutações, sendo este último, realizado em laboratório externo (IDEXX). Estas técnicas podem utilizar como amostras: líquido de derrame, amostras colhidas por PAAF ou biópsias de lesões, líquido retroperitoneal e ainda LCR. Todos os resultados obtidos, pelos métodos de diagnóstico acima citados, foram avaliados no contexto da história clínica, dos diferentes sinais clínicos e alterações laboratoriais encontradas.

10.2. Exame clínico

No dia da admissão de cada paciente, bem como durante a hospitalização, foi realizado o exame físico dos animais. Este exame incluiu parâmetros como a avaliação da

coloração das mucosas, tempo de repleção capilar, frequência cardíaca e respiratória, temperatura e palpação abdominal. Outros achados clínicos foram ainda registados, tais como a presença e tipo de derrames cavitários, torácicos, abdominais e/ou pericárdicos, e toda a sintomatologia, abrangendo sinais inespecíficos, neurológicos e oculares.

10.3. Classificação das formas clínicas

Todos os felídeos que apresentaram derrames cavitários no decorrer do seu quadro clínico, foram classificados com forma efusiva. Os felídeos que não apresentaram qualquer derrame no decorrer do quadro clínico, foram classificados com forma seca da doença. Finalmente, os felídeos classificados com forma mista da doença correspondem a animais com quadro clínico de PIF seca, que em fases terminais da doença desenvolveram derrames cavitários.

10.4. Fontes de dados

Foi utilizada uma base de dados, criada em Microsoft® Office Excel 365 para Windows®, editada com base em informação recolhida a partir de três fontes distintas. As referidas fontes incluem relatórios clínicos dos pacientes, disponíveis nos programas de gestão de clínicas veterinárias GuruVet e Qvet, utilizado pelo HE da FMV, e fichas clínicas arquivadas em papel de alguns pacientes da UICB.

10.5. Análises estatísticas

A análise estatística do presente estudo, foi realizada recorrendo ao programa de análise Rx64, versão 4.0.3. A possível associação entre a mutação detetada por RT-PCR com pirosequenciação e a forma clínica foi avaliada por meio de um teste de qui-quadrado (χ^2) de Pearson, para um intervalo de confiança de 95%, sendo a probabilidade de significância 0,05 (nível de significância de 5%). O Teste de Fisher foi também realizado para calcular o p-value, visto existirem células com valores inferiores a 5 nas tabelas de contingência construídas.

A análise da sobrevivência foi obtida através da execução de uma curva de Kaplan-Meier.

11. Resultados

11.1. Caracterização da população de felídeos diagnosticados com PIF na UICB por meio de métodos de diagnóstico molecular

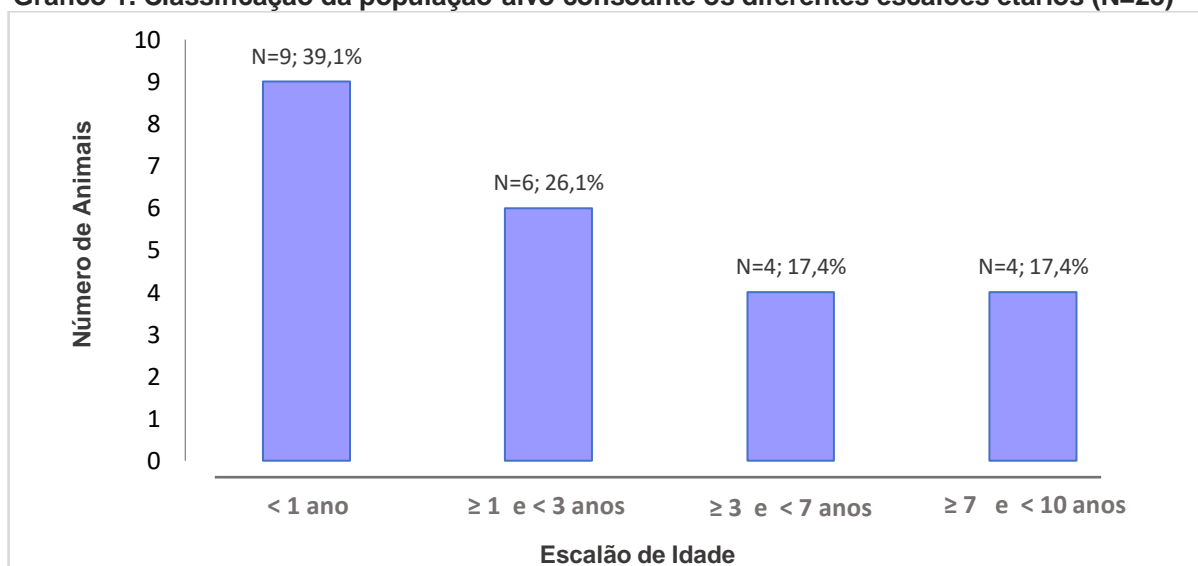
11.1.1. Sexo e estatuto reprodutivo

Dos 23 felídeos incluídos no presente estudo, 12 (52,2%) eram do sexo feminino e 11 (47,8%) eram do sexo masculino. Relativamente ao estatuto reprodutivo da população alvo, foram observados 12 animais (52,2%) esterilizados, sendo os restantes 11 gatos (47,8%) inteiros.

11.1.2. Idade

A população-alvo foi classificada de acordo com 4 escalões de idades, sendo que, segundo os dados do gráfico 1, dos 23 felídeos analisados, 9 gatos (39,1%) apresentaram idade inferior a 1 ano, 6 gatos (26,1%) idade igual ou superior a 1 ano e inferior a 3 anos, 4 gatos (17,4%) idade igual ou superior a 3 anos e inferior a 7 anos e, por fim, 4 gatos (17,4%) apresentaram idade igual ou superior a 7 anos e inferior a 10 anos.

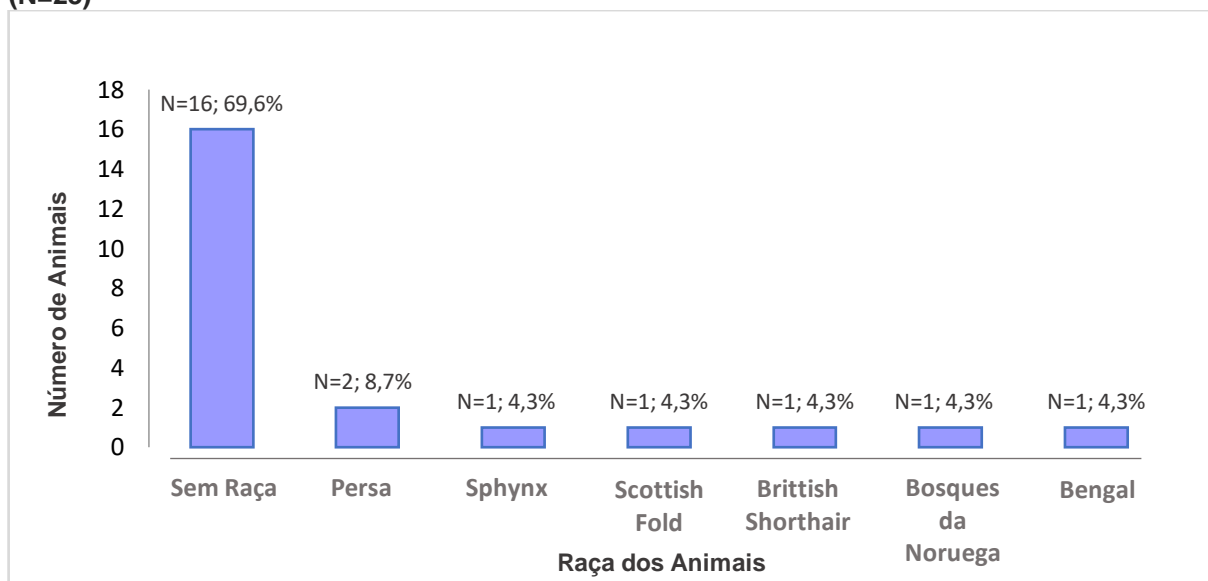
Gráfico 1. Classificação da população-alvo consoante os diferentes escalões etários (N=23)



11.1.3. Raça

Os 23 felídeos admitidos na UICB, incluídos no presente estudo, foram classificados quanto à sua raça. Os resultados obtidos, esquematizados no gráfico 2, demonstraram a presença das seguintes raças: 2 gatos (8,7%) Persa, 1 gato (4,3%) Sphynx, 1 gato (4,3%) Scottish Fold, 1 gato (4,3%) British Shorthair, 1 gato (4,3%) Bosques da Noruega, 1 gato (4,3%) Bengal. Os restantes 16 felídeos (69,6%) foram classificados como animais sem raça definida.

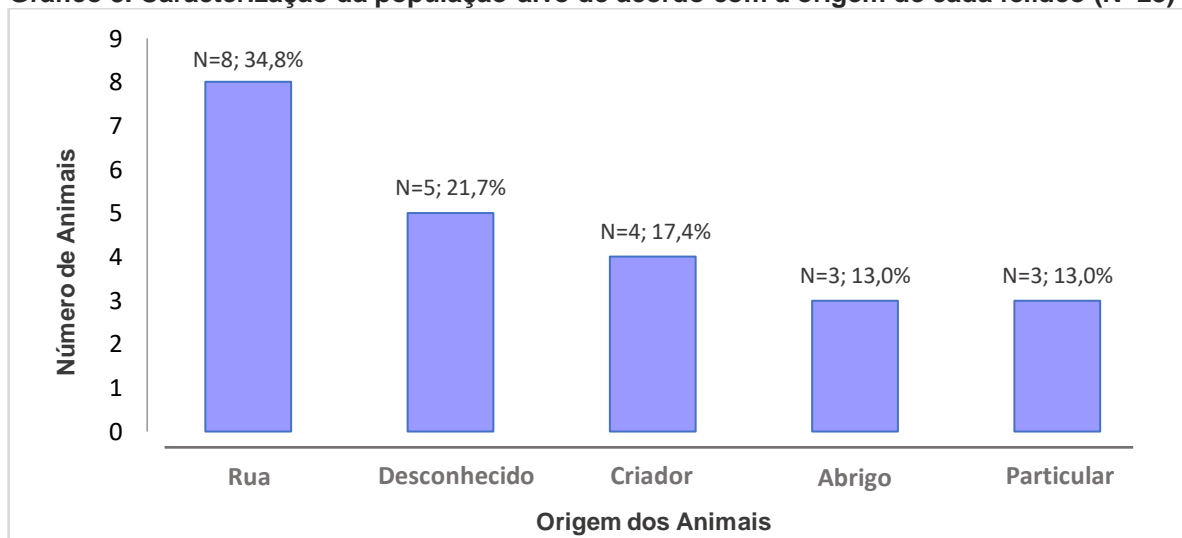
Gráfico 2. Classificação da população-alvo de acordo com respetiva raça de cada felídeo (N=23)



11.1.4. Origem

Os 23 felídeos investigados no presente trabalho, foram agrupados consoante a sua origem, como é possível observar no gráfico 3. Segundo os resultados obtidos nesta análise, 8 gatos (34,8%) foram recolhidos da rua, 4 gatos (17,4%) adquiridos a criadores, 3 gatos (13,0%) adoptados de abrigos, 3 gatos (13,0%) oferecidos por particulares e os restantes 5 gatos (21,7%) de origem desconhecida.

Gráfico 3. Caracterização da população-alvo de acordo com a origem de cada felídeo (N=23)

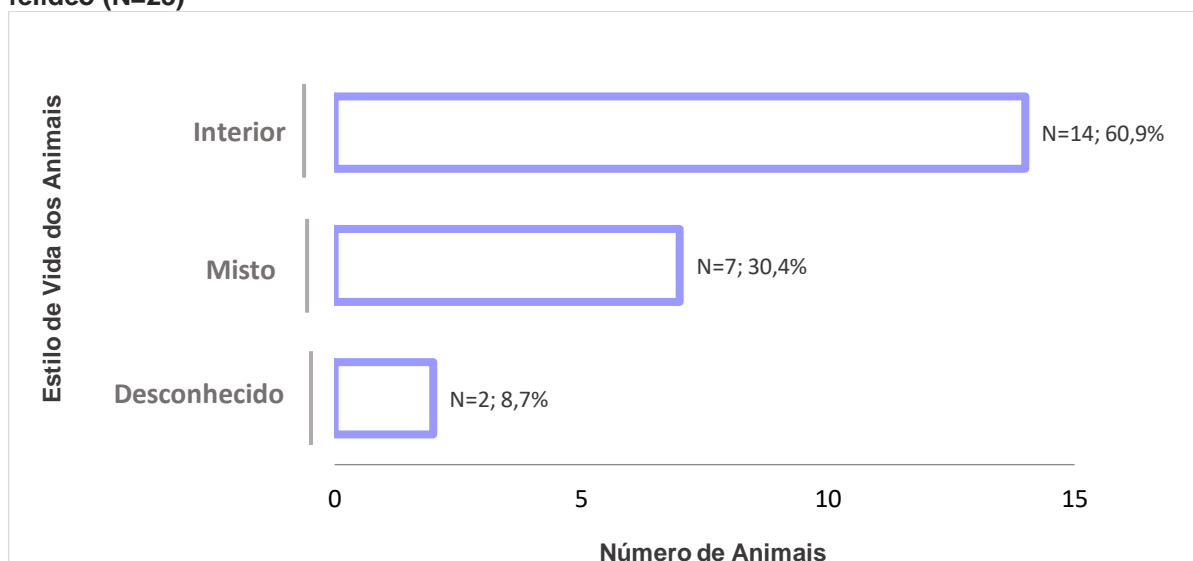


11.1.5. Estilo de vida

Os 23 gatos abrangidos no presente estudo foram classificados de acordo com o estilo de vida adotado por cada animal, tendo sido obtidos os seguintes resultados (gráfico 4): 14 gatos (60,9%) apresentaram estilo de vida exclusivamente de interior, 7 gatos (30,4%) apresentaram estilo de vida misto e nos restantes 2 gatos (8,7%) não foi possível

obter informação sobre o estilo de vida adotado, sendo considerados animais com estilo de vida desconhecido.

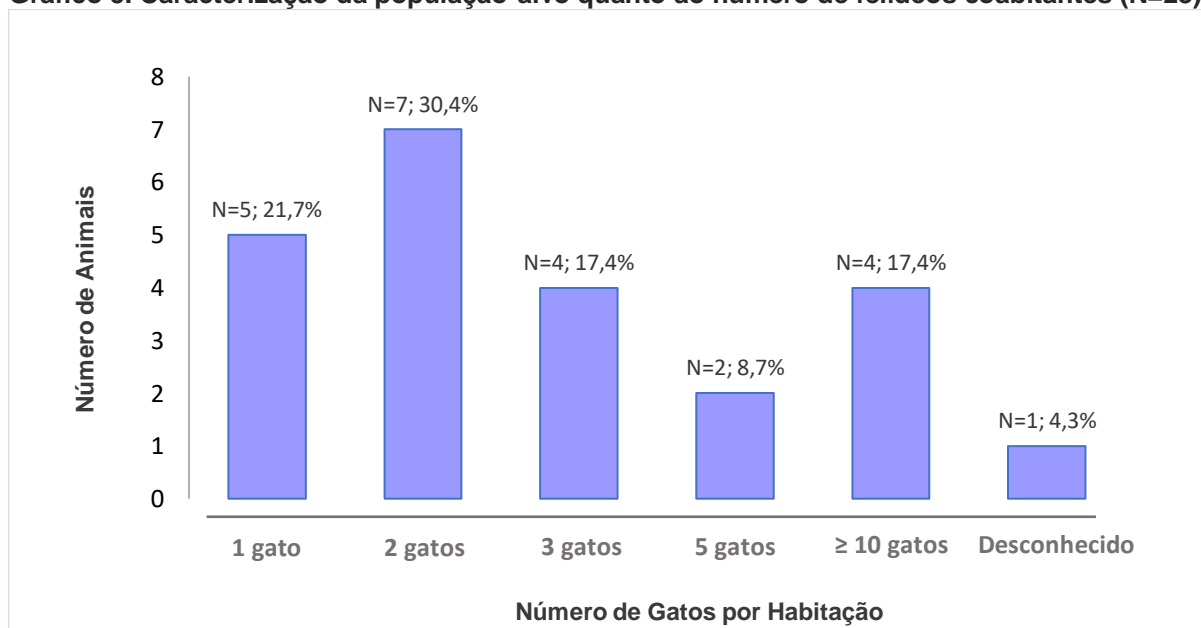
Gráfico 4. Caracterização da população-alvo de acordo com o estilo de vida adotado por cada felídeo (N=23)



11.1.6. Número de felídeos coabitantes

A população-alvo foi avaliada quanto ao número de gatos coabitantes, estando os resultados desta análise expostos no gráfico 5. Dos 23 felídeos avaliados, 5 (21,7%) não tinham gatos coabitantes, 7 (30,4%) coabitavam com mais 1 gato, 4 (17,4%) coabitavam com mais 2 gatos, 2 (8,7%) coabitavam com mais 4 gatos, 4 (17,4%) coabitavam com 10 ou mais gatos e, por fim, 1 gato (4,3%) apresentou número de gatos coabitantes desconhecido.

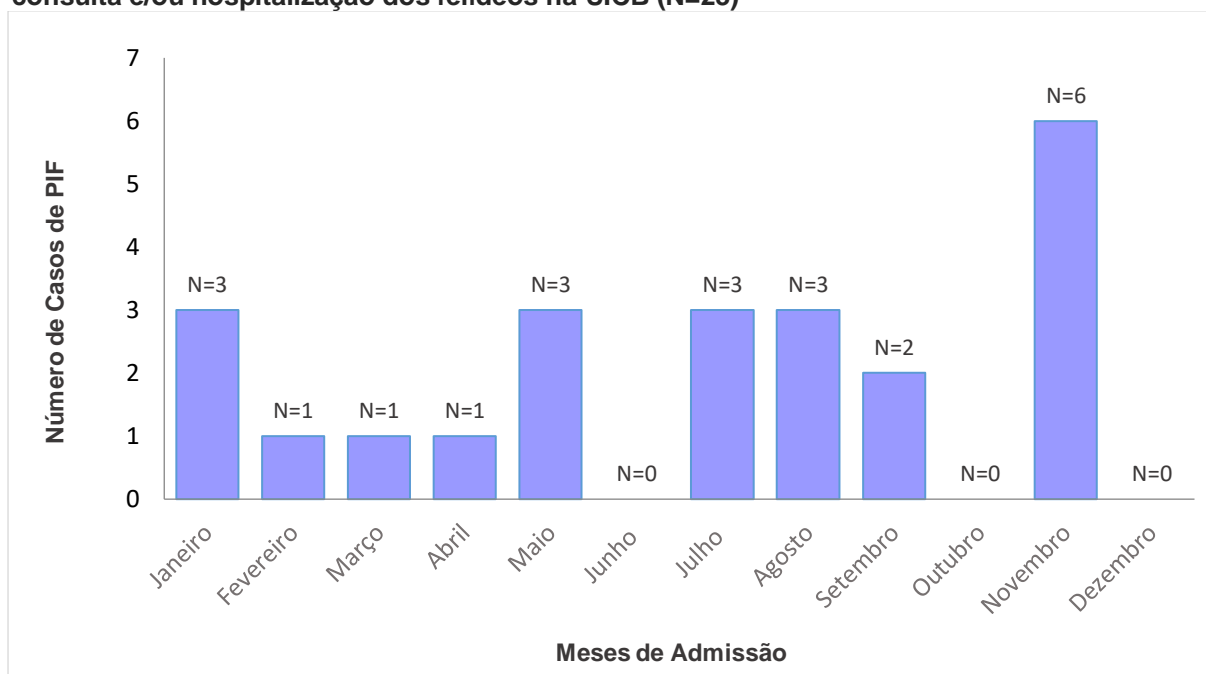
Gráfico 5. Caracterização da população-alvo quanto ao número de felídeos coabitantes (N=23)



11.1.7. Caracterização temporal dos casos de PIF

A população-alvo do presente estudo foi submetida a uma caracterização temporal do aparecimento dos casos de PIF, tendo sido avaliada de acordo com o mês de admissão para consulta e/ou hospitalização na UICB. Esta avaliação, esquematizada pelo gráfico 6, permitiu verificar que no mês de janeiro, maio, julho e agosto foram admitidos 3 gatos, em cada um, em fevereiro foi admitido apenas 1 gato, assim como o sucedido no mês de março e abril, e em setembro foram admitidos 2 gatos. Os restantes 6 felídeos foram admitidos no mês de novembro, constituindo assim o mês em que se registou o maior número de casos de PIF. Esta análise permitiu ainda verificar que, ao longo de 8 anos, não houve registo de qualquer animal admitido na UICB com PIF nos meses de junho, outubro e dezembro.

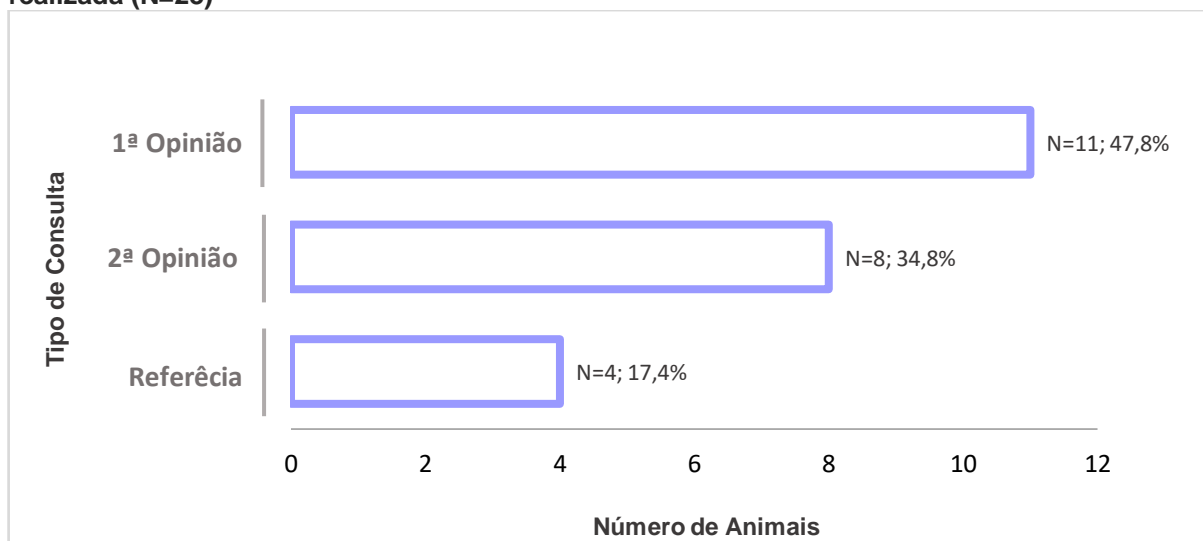
Gráfico 6. Caracterização temporal da população-alvo de acordo com o mês de admissão para consulta e/ou hospitalização dos felídeos na UICB (N=23)



11.1.8. Tipo de consulta de admissão

Os 23 felídeos analisados foram classificados quanto ao tipo de consulta de admissão realizada, sendo esta análise representada pelo gráfico 7. Os resultados da referida análise demonstraram que 11 gatos (47,8%) realizaram consulta de primeira opinião, 8 gatos (34,8%) realizaram consulta de segunda opinião e apenas 4 animais (17,4%) realizaram consulta de referência.

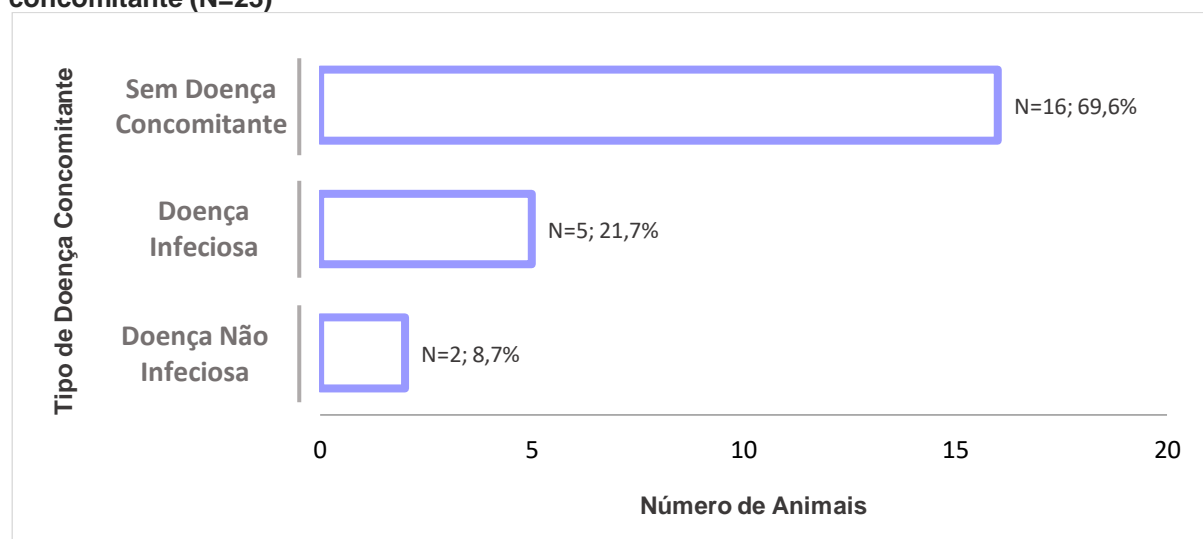
Gráfico 7. Caracterização da população-alvo de acordo com o tipo de consulta de admissão realizada (N=23)



11.1.9. Presença e tipo de doenças concomitantes

A população-alvo do presente estudo foi avaliada quanto à presença e tipo de doença concomitante apresentada, sendo os resultados obtidos apresentados no gráfico 8. Dos 23 felídeos analisados 16 gatos (69,6%) não apresentaram qualquer doença concomitante, 2 gatos (8,7%) apresentaram doença de origem não infecciosa e os restantes 5 gatos (21,7%) apresentaram doença de origem infecciosa. No grupo de gatos com doença de origem não infecciosa foi encontrado 1 gato com insuficiência renal crônica e 1 gato com cistite idiopática e infecção de trato urinário. No grupo das doenças de origem infecciosa foi encontrado 1 gato com infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), 3 gatos com doença do trato respiratório superior felino (DTRSF) e 1 gato com infecção pelo vírus da panleucopénia felina.

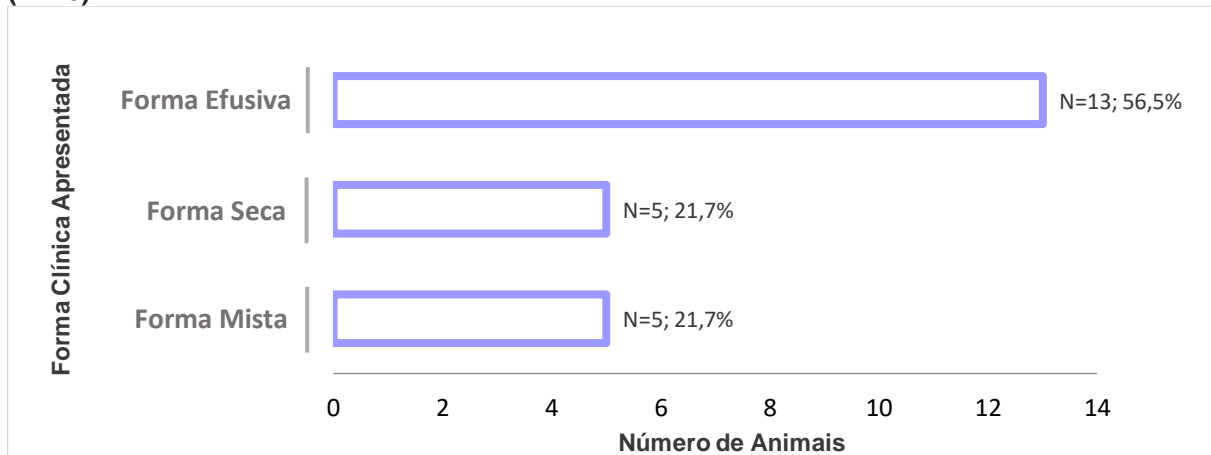
Gráfico 8. Caracterização da população-alvo de acordo com a presença e tipo de doença concomitante (N=23)



11.1.10. Apresentação Clínica

11.1.10.1. Formas clínicas

Gráfico 9. Caracterização da população-alvo de acordo com a forma clínica de PIF apresentada (N=23)



Os 23 felídeos admitidos na UICB foram classificados de acordo com a forma clínica de PIF desenvolvida, obtendo-se os seguintes resultados (apresentados no gráfico 9): 13 gatos (56,5%) apresentaram forma efusiva, 5 gatos (21,7%) apresentaram forma seca e 5 gatos (21,7%) apresentaram forma mista.



Figura 3. Fêmea inteira de 1 ano de idade, sem raça definida, hospitalizada na UICB com forma mista de PIF na fase inicial de progressão da doença. Apresentou, nesta fase, quadro de colite grave e piréxia. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB.



Figura 4. Fêmea inteira de 1 ano de idade, sem raça definida, hospitalizada na UICB com forma mista de PIF, apresentando distensão abdominal, secundária a derrame peritoneal, na fase terminal da doença. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB.

11.1.10.2. Sinais clínicos

Os 23 felídeos avaliados no presente estudo foram submetidos a exame clínico, aquando da sua admissão na UICB para consulta e/ou hospitalização, tendo sido registada toda a sintomatologia e parâmetros clínicos. Contudo, a presente análise destina-se à obtenção de informação sobre os parâmetros e sinais clínicos da totalidade do quadro clínico de PIF, pelo que engloba não só os sinais e parâmetros clínicos iniciais de cada forma da doença, mas também todos aqueles que se desenvolveram no decorrer do quadro clínico. É ainda importante referir que vários gatos apresentaram mais do que um tipo de sinal clínico, ao longo de todo o quadro de PIF.

Tabela 1. Caracterização da sintomatologia da população-alvo de acordo com a forma clínica apresentada por cada felídeo ao longo de todo o quadro clínico de PIF (N=23)

	Forma Efusiva (N=13)		Forma Seca (N=5)		Forma Mista (N=5)		População-Alvo (N=23)	
	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%
Sinais Inespecíficos	13	100,0	5	100,0	5	100,0	23	100,0
Sinais Oculares	1	7,7	3	60,0	1	20,0	5	21,7
Sinais Neurológicos	3	23,1	4	80,0	4	80,0	11	47,8
Sinais Gastrointestinais	4	30,8	2	40,0	3	60,0	9	39,1
Piréxia	4	30,8	3	60,0	5	100,0	12	52,2
Derrames	13	100,0	0	0,0	5	100,0	18	78,3

Na tabela 1 podemos observar que dos 13 felídeos que apresentaram forma clínica efusiva, 13 (100,0%) demonstraram sinais inespecíficos, apenas 1 (7,7%) apresentou sinais oculares, 3 (23,1%) apresentaram sinais neurológicos, 4 (30,8%) apresentaram sinais gastrointestinais, 4 (30,8%) apresentaram piréxia e 13 (100,0%) apresentaram derrames. Relativamente aos 5 gatos com forma seca, 5 gatos (100,0%) apresentaram sinais inespecíficos, 3 gatos (60,0%) apresentaram sinais oculares, 4 gatos (80,0%) apresentaram sinais neurológicos, 2 (40,0%) apresentaram sinais gastrointestinais e 3 gatos (60,0%) apresentaram piroxia. Os restantes 5 felídeos apresentaram forma mista da doença, sendo que a totalidade destes animais (100,0%) apresentou sinais inespecíficos, piroxia e derrames, apenas 1 (20,0%) apresentou sinais oculares, 4 (80,0%) apresentaram sinais neurológicos e 3 (60,0%) apresentaram sinais gastrointestinais. Realizou-se, também, a avaliação da sintomatologia tendo em conta a totalidade da população-alvo e verificou-se que a totalidade dos gatos (N=23, 100,0%) apresentou sinais inespecíficos, 5 gatos (21,7%) apresentaram sinais oculares, 11 gatos (47,8%) apresentaram sinais neurológicos, 9 gatos (39,1%) apresentaram sinais gastrointestinais, 12 gatos (52,2%) apresentaram piroxia e 18 gatos (78,3%) apresentaram derrames.

No que diz respeito às alterações oculares, a uveíte foi a mais frequentemente

registada, em 3 (60%) dos 5 gatos com alterações oculares, seguida da observação de precipitados queráticos e *flare* do humor aquoso, registada em 2 (40%) dos 5 gatos com alterações oculares. O sinal neurológico mais frequentemente registado foi a ataxia, presente em 7 (63,6%) dos 11 gatos com alterações neurológicas. Observou-se ainda, alteração de estado mental em 4 gatos (36,4%) e sinais vestibulares, parésia e alteração de comportamento, em 3 gatos (27,3%). Nos 9 felídeos com sintomatologia gastrointestinal, o sinal clínico mais comum foi diarreia, registada em 7 gatos (77,8%), seguida de vômito, registado em 6 gatos (66,7%), e sialorreia, registada em apenas 4 animais (44,5%). Por fim, dos 12 gatos que apresentaram pirexia no decorrer do quadro clínico de PIF, 8 felídeos (66,7%) atingiram temperaturas iguais ou superiores a 40,0°C.

Gráfico 10. Identificação do tipo de derrame desenvolvida durante o quadro clínico de PIF dos felídeos admitidos na UICB que apresentaram derrames cavitários (n=18)

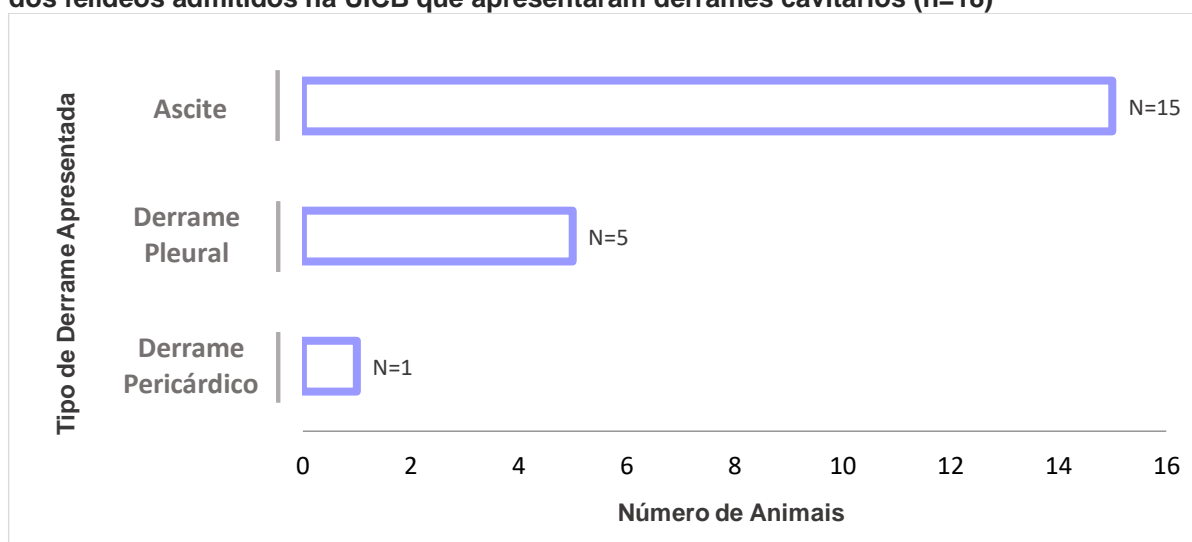


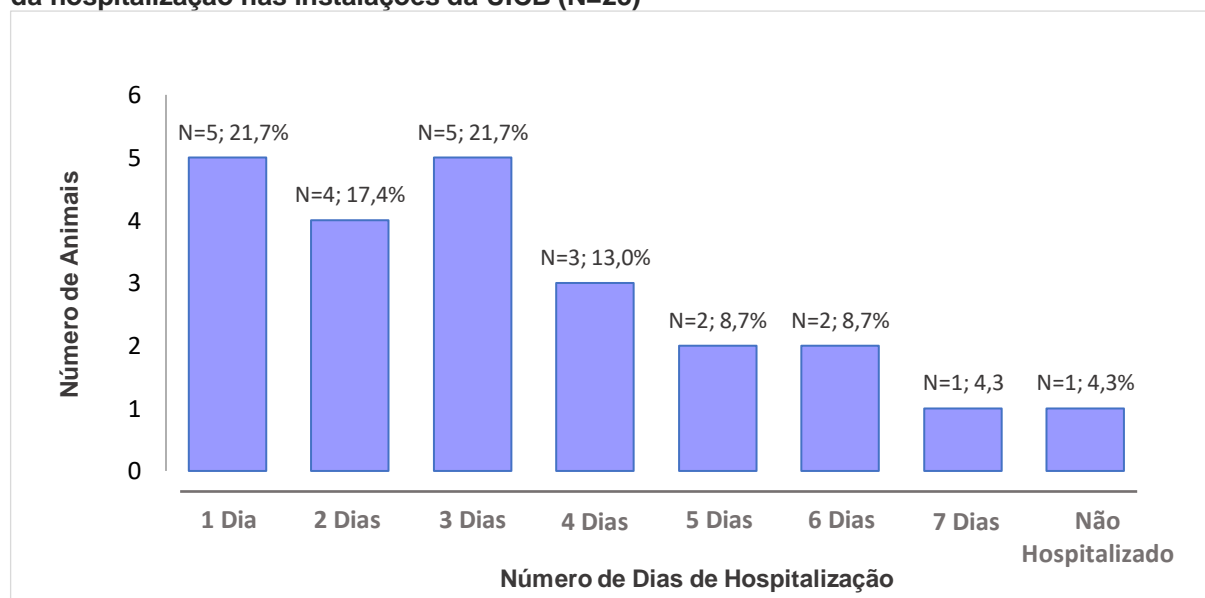
Figura 5. Líquido de derrame abdominal de um felídeo com PIF, hospitalizado na UICB, colhido por abdominocentese. Imagem obtida no decorrer do estágio curricular na UICB.

Os 18 felídeos, pertencentes às formas mistas e efusivas da doença, apresentaram diferentes tipos de derrame, sendo que alguns gatos demonstraram mais do que 1 tipo de derrame. Segundo os dados presentes no gráfico 10, verificamos que os felídeos foram analisados quanto ao tipo de derrame apresentado e que, dos 18 animais, 15 gatos (83,3%) apresentaram ascite, 5 gatos (27,8%) apresentaram derrame pleural e apenas 1 gato (5,6%) apresentou derrame pericárdico.

11.1.11. Caracterização da hospitalização

A população-alvo foi avaliada quanto à ocorrência de hospitalização, no decorrer do quadro clínico, e a sua respectiva duração, em dias. A mediana da duração da hospitalização foi $3 \pm 1,8$ dias. Os resultados obtidos desta avaliação (gráfico 11) demonstraram que, dos 23 felídeos avaliados, houve apenas 1 gato (4,3%) não hospitalizado (0 dias de hospitalização), 5 gatos (21,7%) apresentaram uma duração de hospitalização de 1 dia, 4 gatos (17,4%) apresentaram uma duração de 2 dias, 5 gatos (21,7%) apresentaram uma duração de 3 dias, 3 gatos (13,0%) apresentaram uma duração de 4 dias, 2 gatos (8,7%) apresentaram uma duração de 5 dias, 2 gatos (8,7%) apresentaram duração de 6 dias e, por fim, 1 gato (4,3%) demonstrou uma duração de 7 dias de hospitalização. Relativamente ao felídeo não hospitalizado, sabe-se que foi admitido para consulta e continua, até à data, em seguimento do quadro de PIF nas instalações da UICB do HE.

Gráfico 11. Caracterização da população-alvo de acordo com a ocorrência e duração em dias da hospitalização nas instalações da UICB (N=23)

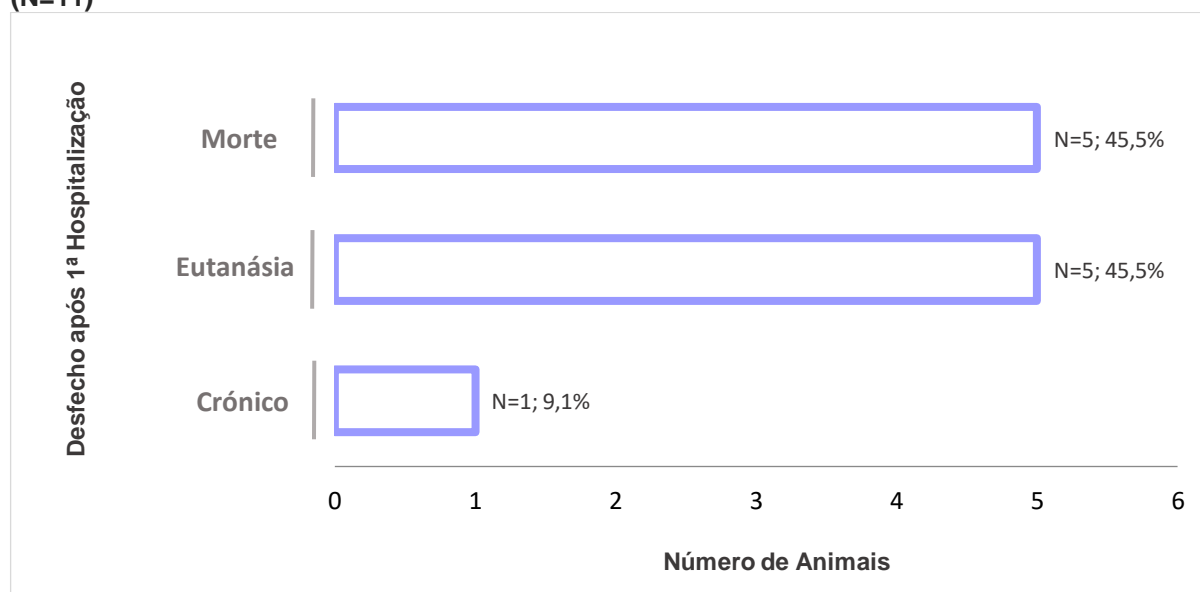


11.1.12. Seguimento após primeira hospitalização

A população-alvo do presente estudo é constituída por 23 felídeos, dos quais 22 foram hospitalizados nas instalações da UICB da FMV, como referido anteriormente. Destes 22 animais, apenas 11 felídeos obtiveram alta após a primeira hospitalização. O seguimento

dos 11 gatos foi realizado e registado, tanto por consultas de seguimento, como por contacto telefónico e electrónico com tutores de gatos que deixaram de ser seguidos na UICB. Os resultados obtidos são representados pelo gráfico 12, no qual se verificou que, após primeira hospitalização, 5 gatos (45,5%) faleceram, 5 gatos (45,5%) foram submetidos a eutanásia e 1 gato (9,1%) permaneceu crónico. Este último felídeo foi classificado como crónico visto que, no último registo obtido, o animal estava medicado e foi considerado estável.

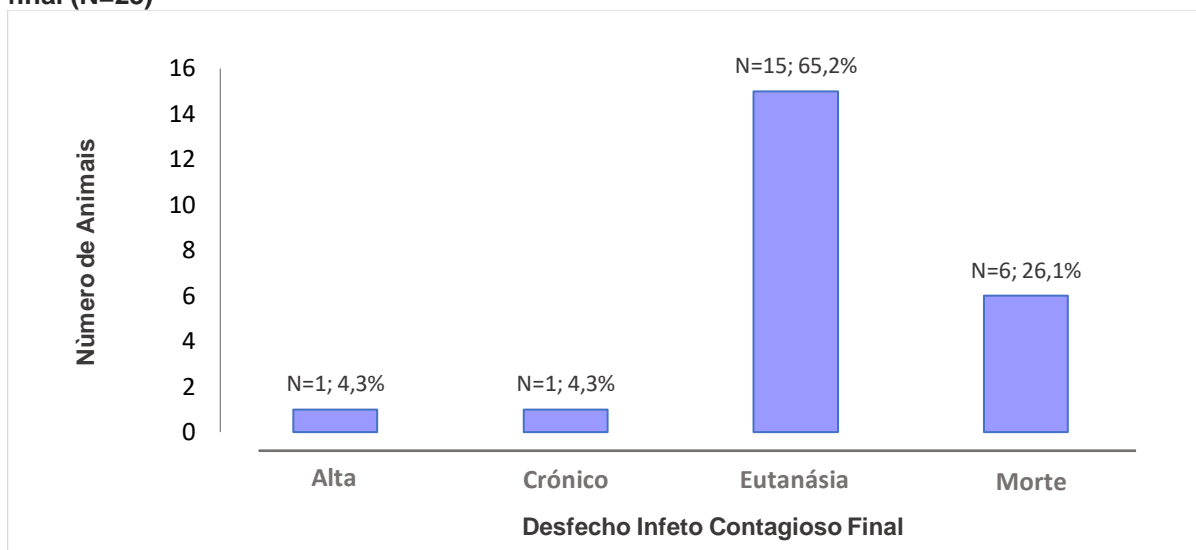
Gráfico 12. Seguimento dos felídeos que obtiveram alta após primeira hospitalização na UICB (N=11)



11.1.13. Caracterização do desfecho infeto contagioso

O desfecho infeto contagioso dos 23 felídeos constituintes da população-alvo foi registado, tendo sido observados os seguintes resultados (esquematizados no gráfico 13): 1 gato (4,3%) teve alta, 1 gato (4,3%) foi considerado crónico, 6 gatos (26,1%) faleceram e os restantes 15 gatos (65,2%) foram submetidos a eutanásia. Na presente análise, considerou-se desfecho infeto contagioso: crónico, em felídeos não hospitalizados que permaneceram estáveis após admissão na UICB; alta, em felídeos hospitalizados, os quais tiveram alta da UICB, permanecendo estáveis após a mesma; eutanásia, em felídeos que foram submetidos a eutanásia durante a hospitalização na UICB ou após a mesma; morte, em felídeos que faleceram durante a hospitalização na UICB ou após a mesma.

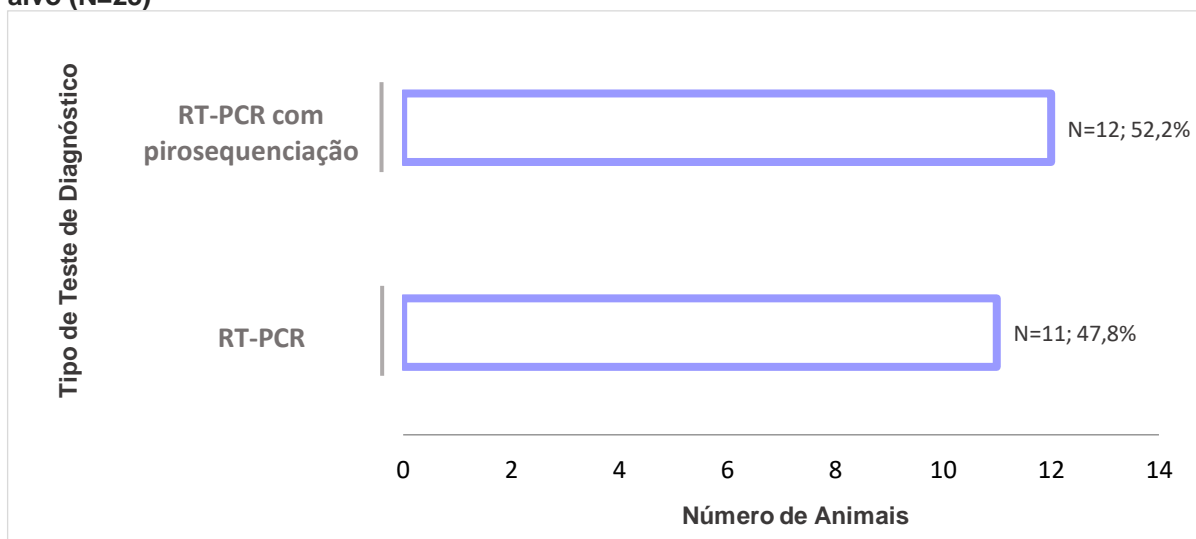
Gráfico 13. Caracterização da população-alvo de acordo com o desfecho infeto contagioso final (N=23)



11.2. Métodos de diagnóstico definitivo

Os 23 felídeos, constituintes da população-alvo no presente trabalho, foram submetidos a diagnóstico molecular, nomeadamente diagnóstico por RT-PCR em tempo real. Segundo os dados presentes no gráfico 14, 12 gatos (52,2%) realizaram RT-PCR com pirosequenciação para deteção de mutações e 11 gatos (47,8%) realizaram RT-PCR sem pirosequenciação.

Gráfico 14. Método de diagnóstico definitivo aplicado aos felídeos constituintes da população-alvo (N=23)

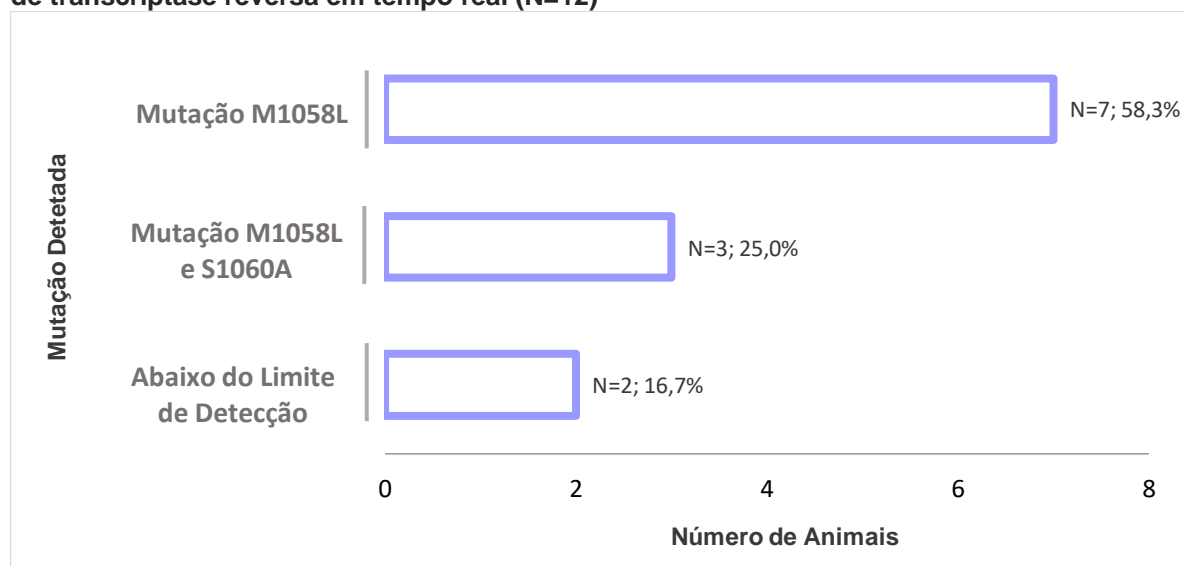


11.2.1. Mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação

Segundo a informação do gráfico anterior, dos 23 felídeos avaliados neste estudo, apenas 12 realizaram a técnica de RT-PCR em tempo real com pirosequenciação para deteção de mutações. Os resultados obtidos para estes 12 felídeos estão esquematizados no gráfico 15, sendo que em 7 gatos (58,3%) foi detetada apenas a mutação M1058L, em 3

gatos (25,0%) foram detetadas ambas as mutações M1058L e S1060A e nos restantes 2 gatos (16,7%) não foi possível a deteção das mutações.

Gráfico 15. Mutação detetada nos felídeos admitidos na UICB testados pela técnica de PCR de transcriptase reversa em tempo real (N=12)



11.3. Correlação entre as formas clínicas e a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação

Tabela 2. Correlação entre as formas clínicas apresentadas e a mutação detetada nos felídeos admitidos na UICB que realizaram RT-PCR em tempo real com pirosequenciação (N=10)

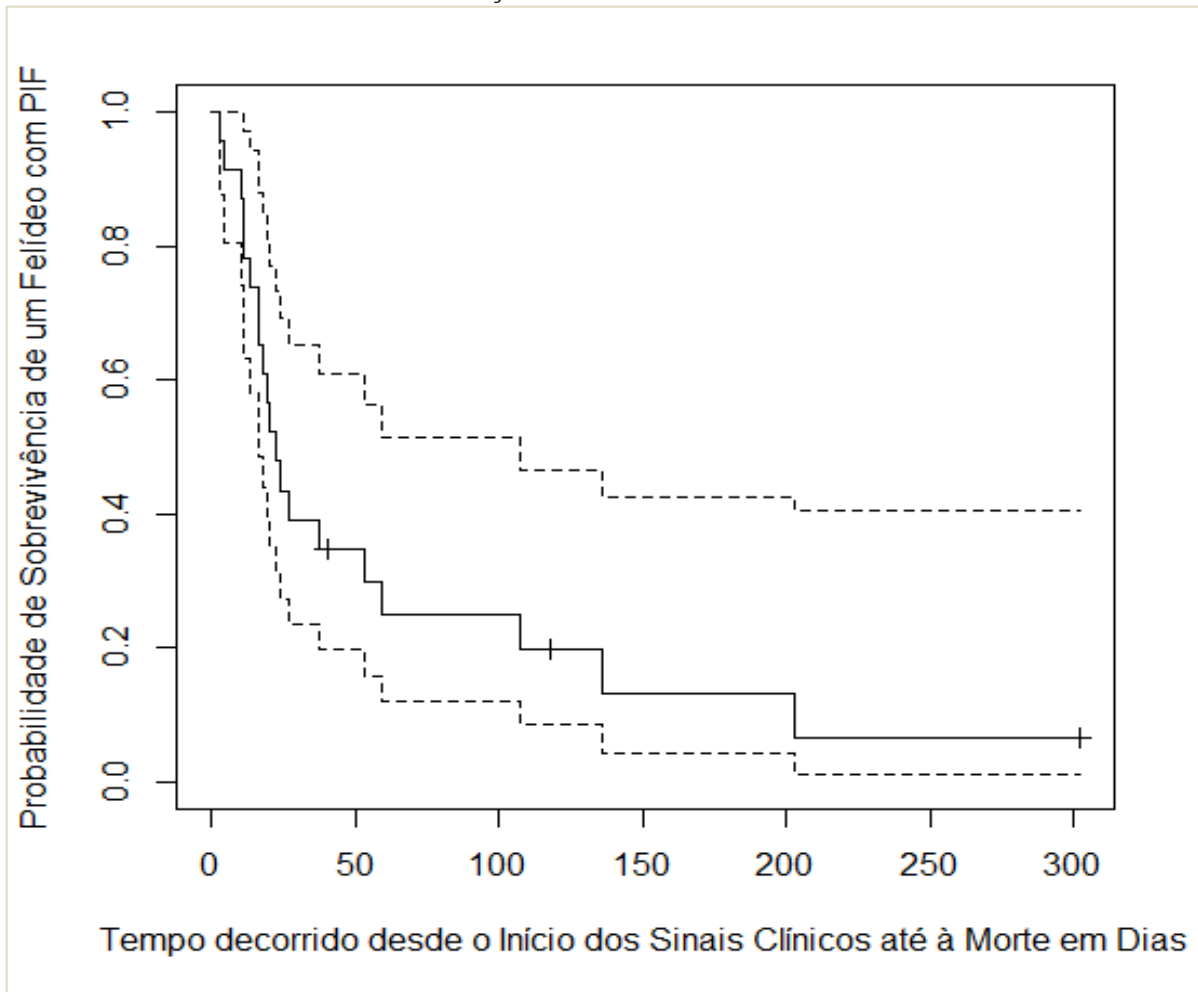
	Forma Efusiva		Forma Mista		Forma Seca		Total de Gatos por Mutação		Valor de p
	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%	Valor Absoluto	%	
Mutação M1058L	3	42,9	2	28,6	2	28,6	7	100,1	0,3
Mutação M1058L e S1060A	3	100,0	0	0,0	0	0,0	3	100,0	

No presente estudo, foi avaliada a possível associação entre a forma clínica de PIF apresentada e a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação.

Na tabela 2 são apresentados os resultados relativos aos 10 felídeos em que foi possível detetar as mutações investigadas, podendo observar-se as frequências relativas e o valor de p calculado pelo teste exato de Fisher, para um intervalo de confiança (IC) de 95%. Segundo os dados apresentados na tabela 2, podemos perceber que todos os animais apresentaram mutação M1058L e apenas 3 apresentaram a mutação S1060A, sendo que todos (n=3, 100%) os gatos portadores do vírus com a mutação S1060A apresentaram forma clínica efusiva da doença, sendo o valor de p da presente análise 0,3.

11.4. Análise de sobrevivência

Gráfico 16. Análise de sobrevivência através da execução de uma curva Kaplan-Meier com intervalo de confiança (IC) de 95%, a qual demonstra a associação entre a probabilidade de sobrevivência de um felídeo com PIF e o número de dias decorridos entre o início dos sinais clínicos e a sua morte ou última avaliação



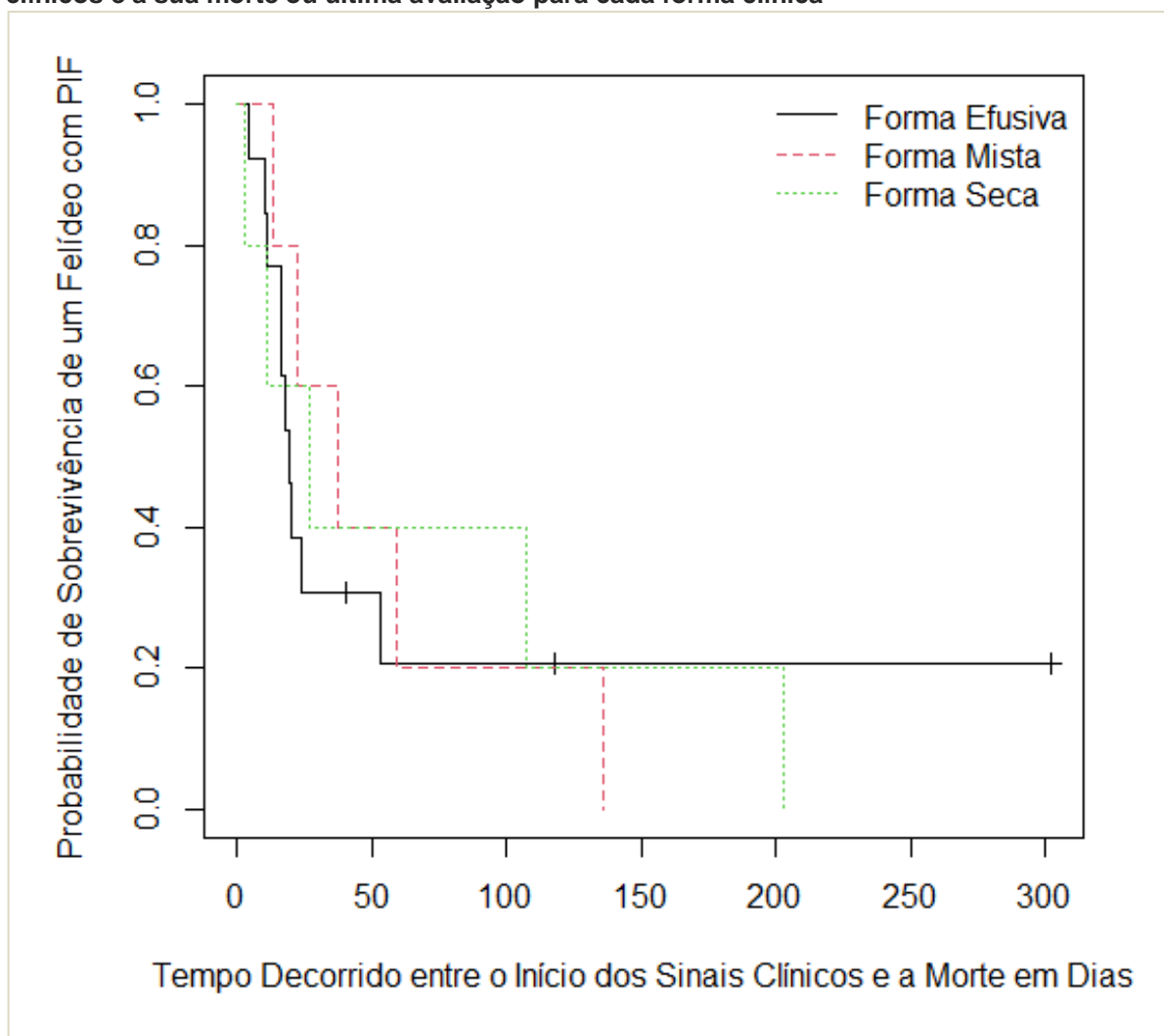
No gráfico 16 pode observar-se que, na população-alvo do presente trabalho (23 felídeos), o valor da probabilidade de sobrevivência de um felídeo com PIF se encontra entre 1,0 e 0,0663, sendo que o tempo de sobrevivência observado, desde o início dos sinais clínicos, se encontra entre períodos de tempo de 3 dias até 302 dias.

Segundo a informação presente no gráfico 16 em conjunto com a tabela 3, presente em anexos, é possível observar que mais de 50% dos gatos não se encontra vivo após 22 dias do início do quadro clínico de PIF, correspondendo este período ao tempo de sobrevivência mediano na população em estudo. Além disso, conseguimos ainda verificar que a probabilidade de sobrevivência decresce para aproximadamente 0.25 (25%) após 59 dias do início da sintomatologia e aumenta para aproximadamente 0.74 (74%) após 13 dias do início da mesma.

Dos 23 animais avaliados neste estudo, apenas 6 gatos se encontravam vivos à data do último seguimento, tendo os restantes 17 felídeos morrido ou sido submetidos a eutanásia. Destes 6 felídeos, 3 sobreviveram pelo período de tempo de 1, 8 e 6 dias, após o

último seguimento. Os restantes 3 animais foram classificados como observações censuradas, sendo que 1 dos felídeos sobreviveu por um período de 210 dias, em 1 dos felídeos não foi possível obter o número de dias de sobrevivência após último seguimento e o último felídeo permanece vivo até à data.

Gráfico 17. Análise de sobrevivência através da execução de uma curva Kaplan-Meier com intervalo de confiança (IC) de 95%, a qual demonstra a associação entre a probabilidade de sobrevivência de um felídeo com PIF e o número de dias decorridos entre o início dos sinais clínicos e a sua morte ou última avaliação para cada forma clínica



No presente trabalho, procedeu-se ainda à avaliação da curva de sobrevivência de cada uma das formas clínicas da doença isoladamente (gráfico 17). Obtivemos os seguintes tempos médios de sobrevivência: 19, 27 e 37 dias para as formas efusiva, seca e mista, respetivamente; não existindo diferenças significativas.

Na análise de ambos os gráficos podemos notar a presença das 3 observações censuradas, referidas anteriormente, as quais são representadas por barras verticais nos mesmos. Estes 3 felídeos foram deste modo classificados por 3 motivos distintos: o primeiro felídeo deixou de ser acompanhado pela equipa da UICB, tendo sido impossível obter a correta data de morte; o segundo felídeo faleceu por doença concomitante (Panleucopenia

Felina) e não pela doença em estudo (PIF); e por fim, o último caso corresponde ao animal que permanece vivo até à data.

12. Discussão

O nosso estudo pretendeu caracterizar a população de felídeos diagnosticados com PIF na UICB, tendo como principal objetivo identificar a possível relação existente entre a forma clínica da PIF apresentada e as mutações virais detetadas por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação. Adicionalmente, foi realizada uma caracterização geral de cada uma das formas clínicas da doença, com base nos sinais clínicos apresentados, e realizada uma análise de sobrevivência da população-alvo.

O diagnóstico definitivo consistiu na execução de RT-PCR em tempo real simples ou com pirosequenciação para deteção de mutações, podendo as amostras utilizadas ser líquido de derrame, PAAF ou biópsias de lesões, líquido retroperitoneal e ainda LCR. Contudo, a obtenção deste diagnóstico apresentou diversas condicionantes, como a condição socio-económica dos tutores e o rigor clínico na requisição de exames complementares de diagnóstico, sendo esta última fortemente influenciada pela própria evolução do conhecimento da doença ao longo do tempo e dos métodos de diagnóstico disponíveis. Existem assim vários motivos pelos quais a condição socio-económica dos tutores e o próprio rigor clínico na escolha dos métodos de diagnóstico comprometem a obtenção do diagnóstico definitivo desta doença.

A PIF é uma doença sistémica progressiva e fatal, sem cura conhecida, razão pela qual muitos tutores, tanto por falta de suporte financeiro para o acompanhamento correto dos seus animais, como pela falta de perspectiva de melhoras para o quadro clínico dos mesmos, optam por tratamento sintomático ou pela eutanásia em fases precoces, sem a realização de qualquer teste de diagnóstico complementar. Por outro lado, os felídeos com PIF apresentam frequentemente quadros clínicos inespecíficos, os quais dificultam a escolha correta dos meios de diagnóstico e interpretação das análises realizadas. Recentemente surgiu a introdução do RT-PCR em tempo real com pirosequenciação para deteção de mutações, o qual por motivos financeiros pode também ter influenciado a escolha de outros meios de diagnóstico complementar. Por fim, além dos motivos financeiros e clínicos que dificultam a obtenção do diagnóstico definitivo, existem ainda as limitações inerentes aos testes de diagnósticos utilizados em si, relacionados com a sensibilidade e especificidade dos mesmos.

12.1. Sexo e estatuto reprodutivo da população-alvo

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que mais de metade dos felídeos em estudo (52,2%) constituía animais do sexo feminino e esterilizados. Estes dados vêm assim contrariar os resultados obtidos em outras pesquisas, os quais defendem a existência de uma predisposição em machos e animais inteiros para o desenvolvimento da doença (Worthing et al. 2012, Sykes 2013). Existem algumas explicações possíveis para ambas as situações.

Relativamente ao sexo, visto o número de fêmeas apenas ter excedido o número de machos por 1 animal, podemos facilmente assumir que esta discrepância de valores se tenha devido ao acaso, não sendo assim significativa. Além disso, há ainda a considerar o facto da UICB constituir um centro de referência de doenças infecciosas e o número reduzido de casos incluídos no estudo, podendo estas situações comprometer a representatividade da amostra em relação à população geral.

Por sua vez, os resultados relativos ao estatuto reprodutivo da população-alvo demonstraram maior número de animais esterilizados, em oposição à ideia de que animais inteiros teriam uma maior predisposição para o desenvolvimento de PIF (Pesteanu-Somogyi et al. 2006), como referido anteriormente. Observando os números, percebemos que, à semelhança da situação anterior, a discrepância de valores é também pouco significativa, podendo também ser atribuída ao acaso. Contudo, existe ainda outra razão plausível para o facto de poder realmente existir um maior número de animais esterilizados, uma vez que o stress constitui um fator fortemente associado ao desenvolvimento da PIF, podendo este ser fruto de inúmeros eventos, entre os quais cirurgias (Sykes 2013).

12.2. Idade

Os resultados demonstraram uma tendência para o desenvolvimento da doença mais acentuado nas faixas etárias mais jovens, nomeadamente em felídeos abaixo dos 3 anos de idade (65,2%), sendo estes dados expectáveis e semelhantes a dados obtidos por pesquisas anteriores (Worthing et al. 2012, Riemer et al. 2016). Sabe-se que os gatinhos muitas vezes apresentam maiores cargas virais quando comparados com felídeos adultos (Greene 2011). Esta situação pode dever-se a vários motivos, como a imaturidade do sistema imunitário dos animais jovens e/ou aos inúmeros eventos causadores de stress a que estes são sujeitos neste período da sua vida, como são exemplo o desmame, vacinações, mudanças de ambiente, entre outros (Greene 2011, Worthing et al. 2012). Posto isto, caso os gatinhos sejam infetados antes da completa maturação do seu sistema imunitário, poderá favorecer a ocorrência de mutações responsáveis pela conversão do FECV em FIPV, predispondo os mesmos ao aparecimento de doença (Pedersen et al. 2008).

Segundo Sykes (2013), a maioria dos felídeos desenvolve doença entre os 3 meses e os 3 anos de idade, sendo que 50% dos animais apresenta idade igual ou inferior a 12 meses. No presente trabalho a percentagem de animais com menos de 1 ano de idade foi de 39,1%, constituindo uma parcela significativa da população-alvo.

Existem ainda alguns autores (Sykes 2013, Tasker 2018) que defendem a ocorrência de um segundo pico de casos de PIF em animais geriátricos (> 10 anos), possivelmente devido à sua função imunitária subóptima. No entanto, não foi observado nenhum caso de um felídeo com mais de 10 anos nesta investigação.

A PIF, apesar de ser uma doença associada a gatos jovens, pode aparecer em qualquer faixa etária (Greene 2011, Sykes 2013). Esta afirmação está também em concordância com os resultados desta pesquisa, na qual foram observados 4 gatos (17,4%) com idade igual ou superior a 3 anos e inferior a 7 anos e 4 gatos (17,4%) com idade igual ou superior a 7 anos e inferior a 10 anos.

12.3. Raça

Surpreendentemente, os resultados relativos à raça dos felídeos constituintes da população-alvo demonstraram que a maioria dos animais (69,6%) não apresentava raça definida, ao contrário do que seria expectável. Várias pesquisas defendem que os gatos de raça pura apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de PIF (Worthing et al. 2012, Sykes 2013), havendo mesmo autores que defendem que esta predisposição possa estar mais associada a certas linhas genéticas dentro de cada raça, do que à própria raça em si (Drechsler et al. 2011). Contudo, existem também pesquisas em que os animais de raça pura não apresentam diferenças significativas quando comparados com a restante população (Tsai et al. 2011, Riemer et al. 2016), dados estes que fornecem suporte aos resultados do nosso trabalho.

Relativamente aos felídeos de raça pura do presente trabalho, o maior número de casos de PIF (N=2, 8,7%) foi observado na raça Persa, apesar da diferença em comparação com as restantes raças ser extremamente ténue. Segundo uma pesquisa realizada em Taiwan (Tsai et al. 2011), também a raça Persa se encontrava entre as mais observadas, possivelmente devido a ser uma das raças de felídeos mais comuns no país, como referido pelos autores. Esta pesquisa veio assim fornecer suporte, não só aos resultados da nossa análise, como também a um dado recentemente apontado por alguns autores (Drechsler et al. 2011, Sykes 2013) que explica que estas predisposições ráticas podem variar tanto geograficamente, como temporalmente.

12.4. Origem

A análise da origem dos felídeos da população-alvo demonstrou que 34,8% dos felídeos em estudo era proveniente da rua. Segundo alguns autores (Greene 2011) os animais de rua, devido ao seu comportamento solitário e hábitos de enterrar as fezes no solo, apresentam uma menor predisposição para a infeção por FCoV. Todavia, uma possível explicação para este resultado é o facto de que estes animais muitas vezes se apresentam em mau estado geral, podendo até apresentar infeções concomitantes, o que por si só poderá comprometer o seu sistema imunitário, predispondo-os à infeção e posterior desenvolvimento de doença.

Verificou-se ainda que a segunda origem mais frequente (17,4%) correspondia a felídeos provenientes de criador. Existem várias razões que suportam este resultado, visto

que estes animais são muitas vezes mantidos em ambientes com elevado número de gatos, os quais constituem um fator de stress e favorecem a maior oportunidade de infeção. Por outro lado, a prática de criação em si, também favorece a perda de vigor híbrido dos animais, podendo assim contribuir para uma maior susceptibilidade à doença nestes animais (Greene 2011).

Observou-se o mesmo número de animais (N=3,13%) provenientes de abrigo e de particulares. Os animais provenientes de abrigos, à semelhança dos animais de criador, estão normalmente expostos a ambientes com elevada densidade populacional, apresentando níveis de stress significativos, tornando-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de doença (Cave et al. 2004).

Esta análise demonstrou ainda uma proporção significativa de animais (21,7%) cuja origem é desconhecida, situação que se deveu a falhas na colheita de dados, como já referido.

12.5. Estilo de vida

O estilo de vida é considerado um fator importante para o desenvolvimento de PIF. Segundo os resultados deste trabalho foi possível verificar que grande parte dos felídeos (60,9%) avaliados apresenta estilo de vida exclusivamente de interior, como seria expectável, enquanto os outros 30,4% apresentaram estilo de vida misto. Os animais de interior estão mais susceptíveis quer à infeção pelo vírus, quer ao posterior desenvolvimento da doença por diversos motivos, comparativamente aos animais de estilo de vida misto e exterior. Primeiramente, os animais exclusivamente de interior, como referido anteriormente, não têm a possibilidade de enterrar as suas fezes no exterior, sendo obrigados a utilizar caixas de areia, muitas vezes partilhada com os restantes gatos da casa. Esta possível densidade populacional elevada e partilha de caixas de areia contribui para o aumento do stress e exposição a agentes presentes nas fezes, pelo que é perceptível que haja maior predisposição para o desenvolvimento de doença nos animais com este estilo de vida (Greene 2011). Por fim, à semelhança da análise anterior, também neste campo foi observada uma certa proporção de animais (N=2, 8,7%) com estilo desconhecido, mais uma vez por falha de colheita de dados aquando da anamnese.

12.6. Número de felídeos coabitantes

Na população-alvo, como seria expectável, os resultados demonstraram que 73,9% dos felídeos partilha o seu ambiente com, pelo menos, mais 1 gato, tendo sido observados apenas 5 felídeos (21,7%) sem coabitantes. Sabe-se que a PIF constitui uma das maiores causas de morte em felídeos jovens e, em especial, felídeos provenientes de ambientes com múltiplos gatos (Sykes 2013). Esta sobrepopulação, como sugerido anteriormente, constitui um fator de stress, o qual pode contribuir para uma aceleração do processo de

replicação viral, favorecendo a ocorrência de mutações e predispondo os animais ao desenvolvimento de doença (Sykes 2013, Tasker 2018). Por outro lado, o vírus é transmitido pela via fecal-oral e como tal a partilha de caixas de areia torna-se de extrema importância neste processo.

12.7. Caracterização temporal do número de casos

A caracterização temporal do número de casos de PIF, ao longo de 8 anos, demonstrou que o mês de novembro corresponde ao mês com maior ocorrência de casos da doença. Além disso, foi ainda observado um maior número de casos de doença nos meses de Outono e Inverno, comparados com os restantes, informação que se encontra em concordância com outras pesquisas que sugerem que podem ocorrer picos de doença nestas estações (Sykes 2013). Uma das hipóteses explicativas para a ocorrência destes picos está relacionada com as condições climatéricas, por vezes, adversas nestas estações, o que por si só pode comprometer o sistema imunitário dos animais, mas também favorecer a concentração de maior número de gatos, devido à procura de abrigos capazes de os proteger do frio e chuva caraterísticos destas épocas do ano. Por outro lado, sabe-se que as estruturas frágeis que os vírus apresentam, em particular os que possuem envelope, como os coronavírus, e a forma como infetam as células-alvo tornam-nos susceptíveis a temperaturas mais elevadas, as quais provocam a desnaturação das proteínas do envelope viral e, conseqüentemente, interferem nos processos de adesão e replicação viral. Várias pesquisas reportaram que a persistência do coronavírus nas superfícies e fomites está dependente de alguns fatores como a temperatura, sendo que quando esta apresenta valores mais reduzidos o vírus sobrevive por maiores períodos de tempo (Aboubakr et al. 2020). Esta informação vem também fornecer suporte aos nossos resultados, visto que nos meses de Outono e Inverno as temperaturas são inferiores, proporcionando maior tempo de permanência do vírus no ambiente e, conseqüentemente, maior probabilidade de transmissão.

Observou-se ainda que nos meses de junho, outubro e dezembro não se registou ocorrência de nenhum caso de PIF, podendo esta situação estar associada às condições socio-económicas dos tutores. O mês de junho e dezembro, por motivos distintos, correspondem a meses em que, muitas vezes, se verifica maior mobilização geográfica por parte da população, mas também maiores gastos económicos. Relativamente ao mês de junho esta situação está frequentemente relacionada com o período de pausas laborais e, como tal, existem gastos acrescidos nas férias em viagens ou outras atividades, podendo comprometer do ponto de vista financeiro as visitas ao veterinário. O mês de dezembro, por sua vez, constitui um mês de festividades, no qual as pessoas apresentam também custos adicionais referentes à época natalícia, razão pela qual as visitas ao veterinário poderão ser também mais escassas. Além disso, em ambos os meses existe uma grande mobilização

geográfica de pessoas, visto que frequentemente se deslocam para os seus destinos de férias ou para visitar familiares durante o natal, podendo esta situação também condicionar a vinda ao veterinário.

12.8. Tipo de consulta

Identificaram-se 3 tipos de consultas diferentes nos felídeos da população-alvo: consulta de primeira opinião, consulta de segunda opinião e consulta de referência. O tipo de consulta observado no maior número de gatos (N=11, 47,8%) foi a consulta de primeira opinião, seguida da consulta de segunda opinião observada em 8 felídeos (34,8%) e, finalmente, da consulta de referência observada nos restantes 4 felídeos (17,4%).

A possível razão para a existência desta proporção significativa de animais admitidos tanto para consulta de primeira, como de segunda opinião pode estar relacionado com o facto do HE, para além de ser um centro de referência, ter uma unidade de isolamento própria com equipa especializada na área de doenças infecciosas. A PIF, sendo uma doença fatal, torna muitas vezes a eutanásia numa hipótese a ser colocada aos tutores, razão pela qual estes podem ser levados a procurar profissionais especializados neste tipo de doença em busca de outras opções, como aconteceu com alguns dos felídeos em estudo. Por outro lado, seria expectável, por este mesmo motivo, que se tivesse observado um número mais significativo de consultas de referência.

A ocorrência desta proporção menos significativa das consultas de referência pode dever-se às condições socio-económicas dos tutores destes animais. Os tutores, como já referido anteriormente, quer por falta de suporte financeiro, quer pela falta de perspectiva de melhoras dos seus animais, podem ser levados a realizar o tratamento paliativo ou mesmo eutanásia com o veterinário assistente, sem qualquer investigação complementar do caso. Finalmente, esta situação pode também estar associada à relutância que alguns colegas veterinários ainda possuem em referenciar casos para outras instituições.

12.9. Doença concomitante

A maioria dos felídeos em estudo (69,6%) não apresentou qualquer doença concomitante. Nos outros 7 gatos, observou-se a presença de doenças de origem infecciosa, em 21,7% dos animais, e de doenças de origem não infecciosa nos restantes 8,7% da população.

Relativamente às doenças de origem não infecciosa observadas, os resultados mostraram a existência de um caso de Doença renal crónica (DRC) e outro de cistite idiopática felina (CIF) e infeção de trato urinário (ITU). No caso da DRC, pode ser explicada pela idade avançada do felídeo em questão (8 anos) visto ser uma doença comum nesta espécie e escalão etário (Reynolds and Lefebvre 2013), existindo estudos que demonstram uma prevalência entre 1,6% e 20% da doença na população de felídeos, com cerca de 53%

dos animais afetados acima dos 7 anos de idade (Ettinger et al. 2017). No segundo caso, por outro lado, temos um gato macho, inteiro de idade inferior a 1 ano, o qual apresentou ITU, com quadro de obstrução uretral parcial. Este felídeo, interessantemente, apresentou também quadro de cistite idiopática felina, a qual constitui uma doença muito associada ao fator stress (Forrester and Towell 2015), fator este que, por sua vez, apresenta também extrema importância no desenvolvimento de PIF. Qualquer uma destas doenças afeta o estado geral de saúde, comprometendo o sistema imunitário do animal e, como tal, é expectável que o possa predispor ao aparecimento de outras doenças, nomeadamente a PIF.

As doenças de origem infecciosa observadas foram infeção pelo vírus da imunodeficiência felina, em 1 felídeo, doença do trato respiratório superior felino, em 3 felídeos, e infeção pelo vírus da panleucopenia felina, em 1 felídeo.

Sabe-se que as infeções por retrovírus são responsáveis por uma imunossupressão importante no animal afetado, tornando-o mais susceptível a doenças, nomeadamente a PIF (Drechsler et al. 2011, Aydin and Yildirim 2019). Existem trabalhos que demonstraram que animais FIV positivos tendem a ter menor capacidade de eliminação da infeção viral pelo FECV e combate às possíveis mutações ocorrentes no processo de replicação viral, favorecendo assim o desenvolvimento de PIF (Poland et al. 1996). Neste sentido, segundo Aydin and Yildirim (2019), as infeções por retrovírus, além de diminuírem a resposta imunitária do animal contra a PIF, têm também a capacidade de acelerar a progressão da doença.

As DTRSF constituem um fator de stress, levando a um comprometimento do sistema imunitário dos animais, capaz de os predispor a outras infeções. Porém, como já referido anteriormente na literatura, a própria infeção inicial pelo FCoV pode originar sintomatologia de trato respiratório superior (Sykes 2013).

Recentemente, alguns autores têm vindo a sugerir que infeções de trato respiratório superior, caracterizadas por conjuntivites e rinites, têm precedido o desenvolvimento de PIF, apesar do FCoV não ser, por rotina, considerado como agente patogénico respiratório (André et al. 2020). Curiosamente, nos 3 casos de DTRSF, reportados no presente trabalho, esta infeção efetivamente precedeu o aparecimento de PIF, estando em concordância com o sugerido pelo estudo anterior. Contudo, por não ter sido realizado qualquer teste para deteção do agente responsável por estas infeções, ambas as hipóteses discutidas acima poderiam ser válidas. Posto isto, a sintomatologia de DTRSF pode dever-se tanto a outro agente respiratório comum, predispondo o animal ao desenvolvimento de PIF, como fazer parte do próprio quadro clínico inicial da doença.

Finalmente, no caso do felídeo que desenvolveu Panleucopenia Felina, esta infeção pode ser explicada pela falta de vacinação adequada neste paciente. Sabe-se que a vacinação é uma das formas mais eficaz na prevenção da Panleucopenia Felina (Sykes

2013), e pelo fato desta ter sido adiada, devido ao desenvolvimento de PIF e consequente terapêutica aplicada, o animal ficou susceptível à infecção viral.

12.10. Formas clínicas apresentadas

A forma clínica com maior frequência foi a forma húmida da doença presente em 56,5% da população-alvo, seguida das formas seca e mista presentes em igual número de felídeos (N=5, 21,7%).

Segundo várias pesquisas (Pedersen 2009, Tsai et al. 2011), a forma clínica de PIF mais comum é a forma húmida, o que está de acordo com o observado no nosso trabalho. Esta discrepância nos resultados pode ainda ser explicada pela dificuldade de diagnóstico inerente à forma seca da doença. O diagnóstico *ante-mortem* de PIF é extremamente desafiante, uma vez que não existem sinais clínicos ou alterações laboratoriais patognomónicas (Riemer et al. 2016, Felten and Hartmann 2019), tendo sido descrita como uma das doenças mais subdiagnosticadas e incorretamente diagnosticada em gatos (Norris et al. 2005). Contudo, a presença de efusões constitui um dos parâmetros mais úteis para o diagnóstico, devendo, sempre que possível, ser retirada uma amostra para análise do fluido (Sykes 2013). Nas formas secas da doença esta análise não é possível, além de que as lesões apresentadas dependem do órgão afetado, podendo demonstrar uma vasta variedade de apresentações clínicas, dificultando assim o diagnóstico. A forma mista, à semelhança da anterior, foi também observada em apenas 5 animais, o que está de acordo com a pesquisa de Pedersen (2009), a qual defende que as formas mistas se manifestam de maneira menos acentuada na natureza.

12.11. Sinais clínicos apresentados nas diferentes formas clínicas

As 3 formas clínicas apresentaram proporções bastante distintas entre si quando analisadas quanto aos sinais clínicos apresentados.

Segundo os resultados apresentados na tabela 1, podemos observar que os sinais oculares foram mais frequentes nos felídeos com forma seca da doença (3 em 5 gatos, 60%) e os sinais neurológicos mais frequentes nas formas seca (4 em 5 gatos, 80%) e mista (4 em 5 gatos, 80%) da doença, em comparação com a forma efusiva, a qual apresentou apenas 7,7% (1 em 13 gatos) e 23,1% (3 em 13 gatos), respetivamente. Estes resultados estão de acordo com a pesquisa de Tsai et al. (2011), na qual também se verificou maior proporção de alterações oculares na forma não efusiva da doença, quando comparada com a forma efusiva. A pesquisa realizada por Norris et al. (2005) obteve resultados semelhantes ao presente trabalho, verificando uma tendência para o aparecimento de doença neurológica mais frequentemente nos felídeos com forma não efusiva de PIF. Em suma, existem várias pesquisas que suportam a ideia de que a forma seca é tipicamente associada a sinais clínicos neurológicos e/ou oculares (Pedersen 2009, Tasker 2018).

Contudo, analisando a população-alvo na sua totalidade (23 felídeos), podemos ainda averiguar a proporção importante que tanto os sinais neurológicos (47,8%), quanto os oculares (21,7%) apresentam nesta doença.

Os felídeos com PIF frequentemente apresentam sinais inespecíficos, em particular nas fases iniciais da doença, podendo estes incluir letargia, anorexia, perda de peso, entre outros (Pedersen 2009, Tasker 2018). Os resultados deste estudo, vieram, mais uma vez, confirmar as pesquisas anteriores, visto a totalidade dos felídeos (N=23) ter apresentado 1 ou mais dos sinais clínicos referidos, independentemente da forma clínica desenvolvida.

Relativamente à pirexia, os animais com forma mista (100%) e seca (60,0%) foram os mais afetados, comparativamente aos animais com forma húmida, dos quais apenas 30,8% foram afetados. Contrariamente ao defendido por investigações anteriores, que demonstraram que a pirexia é mais comum em gatos com efusões (Riemer et al. 2016), o nosso trabalho verificou uma tendência inversa. No presente trabalho, de todos os 18 animais que apresentaram derrames cavitários (formas efusiva e mista) apenas foi registada pirexia (temperatura iguais ou superiores a 39,5°C) em 50%, comparativamente aos gatos com forma seca, em que 60% apresentou pirexia ao longo do quadro clínico. Uma possível explicação para esta tendência, visto não ser uma grande discrepância, é o fato de que um número significativo de felídeos com forma húmida se apresentou para consulta em fases terminais da doença, estando a maioria já hipotérmicos, alguns com temperatura abaixo de 35°C. Assim sendo, estes gatos poderiam ter apresentado pirexia em fases mais iniciais, a qual não pode ser registada. Além disso, avaliando a população-alvo na sua totalidade, verificou-se que 12 dos 23 felídeos (52,2%) apresentou pirexia, e que, por sua vez, em 8 destes 12 felídeos foram registadas temperaturas iguais ou superiores a 40°C, os quais representam 34,8% da população em estudo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no estudo de Yin et al. (2021), o qual obteve 36,5% de gatos com temperatura acima dos 40°C.

Registou-se ainda, todo o quadro clínico gastrointestinal dos felídeos, tendo-se observado apenas uma pequena discrepância entre as proporções das diferentes formas clínicas relativamente aos sinais clínicos apresentados. Sabe-se que em fases iniciais da infeção pelo FECV, alguns animais podem desenvolver sinais gastrointestinais, como vômitos e diarreia (Sykes 2013). Todos os animais avaliados com este tipo de sinais clínicos apresentaram este quadro em fases iniciais da doença, progredindo mais tarde para outras manifestações clínicas, o que nos leva a acreditar que estes sinais clínicos seriam devidos a esta infeção viral inicial.

No presente estudo, foram ainda identificados os sinais clínicos mais frequentes em cada sistema. Começando pelo sistema ocular, a alteração mais comum foi a uveíte, seguida de precipitados queráticos e *flare* do humor aquoso. Estes dados estão em concordância com o referido por diversos autores, os quais defendem que a PIF é uma das

causas mais frequentes de uveíte em felídeos (Pedersen 2009, Barker and Tasker 2020), sendo os precipitados queráticos e *flare* do humor aquoso também sinais clínicos oculares frequentemente observados na doença (Pedersen 2009, Sykes 2013).

O sinal neurológico mais frequentemente observado foi a atáxia, à semelhança das pesquisas realizadas por Riemer et al. (2016) e Crawford et al. (2017). No entanto, foram já reportados outros sinais clínicos comuns como alteração de estado mental e de comportamento, parésia, sinais vestibulares, entre outros (Drechsler et al. 2011, Crawford et al. 2017, Barker and Tasker 2020), também observados em alguns dos felídeos em estudo.

Finalmente, os felídeos que apresentaram derrames no decorrer do quadro clínico foram avaliados quanto ao tipo de derrame cavitário apresentado. O derrame cavitário mais frequente nesta população foi a ascite, presente em 15 (83,3%) dos 18 gatos analisados, em contraste com o derrame pericárdico, o qual foi observado em apenas 1 gato. Segundo outros trabalhos, a ascite constitui de facto a manifestação clínica mais comum (Drechsler et al. 2011, Barker and Tasker 2020, Yin et al. 2021), contrariamente ao derrame pericárdico, menos frequente (Drechsler et al. 2011, Yin et al. 2021).

12.12. Hospitalização

A grande maioria dos animais (22 em 23 felídeos) foi hospitalizada na UICB, sendo a mediana do período de internamento $3 \pm 1,8$ dias. Estes resultados, em particular o curto tempo de duração do internamento, podem ser explicados pelo facto de que alguns destes felídeos chegaram ao hospital em fases terminais da doença, tendo muitos deles morrido ou sido submetidos a eutanásia, durante o mesmo, devido à falta de qualidade de vida por progressão da doença.

12.13. Seguimento

A população-alvo foi ainda acompanhada após a primeira hospitalização, sendo que dos 22 felídeos hospitalizados, apenas 11 (50%) obtiveram alta. Os resultados demonstraram que, destes 11 gatos, 10 morreram ou foram submetidos a eutanásia e apenas 1 se manteve estável à data do último registo. A PIF é uma doença fatal, para a qual não existe tratamento definitivo (Sykes 2013), sendo a eutanásia por vezes sugerida após diagnóstico (Tsai et al. 2011), como tal os resultados obtidos desta pesquisa são assim expectáveis para a doença em questão. Além disso, dos 11 animais que obtiveram alta, 4 felídeos voltaram para segunda hospitalização, sendo que os intervalos entre hospitalizações foram de 6, 7, 3 e 1 meses. Curiosamente 2 dos 4 gatos apresentaram forma seca e 1 forma mista da doença, só tendo sido diagnosticados no segundo internamento. O gato com forma mista apresentou ascite na fase terminal de doença, a qual foi utilizada como amostra para repetir o teste diagnóstico realizado aquando da primeira hospitalização, tendo o resultado sido negativo para uma amostra de tecido hepático obtida

por PAAF. Estes dados suportam mais uma vez a afirmação, anteriormente discutida, de que as formas seca e mista serão mais difíceis de diagnosticar que a forma efusiva.

12.14. Desfecho infeto contagioso

A análise do desfecho infeto contagioso dos felídeos em estudo demonstrou que 15 animais (65,2%) foram submetidos a eutanásia e 6 faleceram (26,1%), constituindo assim mais de 90% da população-alvo, dados estes esperados na PIF, como já discutido no ponto acima. Dos restantes felídeos da população, 1 teve alta após primeira hospitalização e outro foi considerado crónico.

O felídeo que obteve alta, foi assim classificado por se encontrar clinicamente estável à data do último registo, provavelmente devido à medicação de suporte prescrita. O tratamento realizado incluiu a administração de prednisolona, o que em alguns animais pode resultar em remissões temporárias (Sykes 2013). Este animal posteriormente deixou de ser seguido na UICB, não tendo sido possível estabelecer contato com os tutores a fim de obter registo da possível morte ou eutanásia do animal por progressão da doença, constituindo assim uma limitação para a presente análise.

O felídeo considerado crónico, corresponde ao animal não hospitalizado que foi seguido pela equipa da UICB. Esta gata encontra-se clinicamente estável, tendo melhorado bastante o quadro clínico, devido à introdução de uma nova terapêutica, a qual foi instituída externamente à UICB do HE da FMV, provavelmente com recurso às moléculas de GS-441524 ou GC376. Existem várias pesquisas recentes que suportam a eficácia destas moléculas no tratamento de PIF, sendo que ambas inibem a replicação viral e podem levar a uma diminuição da expressão dos sinais clínicos da doença (Pedersen et al. 2018, Pedersen et al. 2019, Yin et al. 2021).

12.15. Métodos de diagnóstico definitivo e mutação detetada

Os dois métodos de diagnóstico definitivo aceites no presente estudo foram RT-PCR em tempo real com pirosequenciação e RT-PCR em tempo real simples. Este último método foi utilizado no diagnóstico de 11 felídeos (47,8%), enquanto os restantes 12 gatos (52,2%) foram diagnosticados com recurso a técnica de RT-PCR com pirosequenciação para deteção de mutações virais. Os resultados obtidos são justificados pelo facto de que esta última técnica só foi disponibilizada no mercado a partir de 2016.

As mutações detetadas pela técnica de RT-PCR em tempo real com pirosequenciação são as seguintes: M1058L, S1060A ou ambas. Na presente pesquisa, 7 dos 12 gatos (58,3%) apresentaram apenas a mutação M1058L, 3 gatos (25,0%) apresentaram ambas as mutações M1058L e S1060A, não se observando nenhum caso em que apenas a mutação S1060A estivesse presente. Nos restantes 2 felídeos (16,7%) não foi possível a deteção de nenhuma das mutações na amostra enviada, provavelmente por esta

apresentar carga viral abaixo de limite de deteção necessário para a técnica. Algumas pesquisas recentes obtiveram resultados muito semelhantes aos do presente trabalho, identificando a mutação M1058L como a mais frequentemente detetada, sendo que a mutação S1060A também não foi detetada isoladamente em nenhuma das amostras analisadas (Sangl et al. 2019; Emmler et al. 2020).

Existem algumas explicações para o facto de não ter sido possível identificar nenhuma das mutações referidas em 2 das amostras enviadas. As amostras enviadas em um dos casos correspondiam a uma combinação de uma amostra de sangue e uma de material colhido através de PAAF de linfonodo mesentérico. Sabe-se que o sangue não constitui uma amostra ideal para deteção de FCoV, visto apresentar baixa carga viral, contrariamente ao linfonodo mesentérico, o qual representa um dos órgãos abdominais com maior carga viral e, como tal, uma das amostras mais úteis no diagnóstico por RT-PCR (Felten and Hartmann 2019). Contudo, alguns autores defendem que a distribuição desta carga viral presente nos tecidos lesionados não é homogénea, constituindo assim uma limitação na colheita e análise realizada a partir de amostras obtidas destes tecidos (Sangl et al. 2019). Esta explicação pode aplicar-se ao caso deste felídeo, mas também ao caso de uma outra gata presente neste trabalho que também obteve um resultado negativo no primeiro RT-PCR, para o qual foi enviada uma amostra de sangue em combinação com uma amostra obtida por PAAF hepática.

No segundo gato em que não foi possível detetar as mutações, a amostra enviada foi líquido de derrame abdominal. A presença de efusões constitui um dos parâmetros mais úteis para diagnóstico *ante-mortem* de PIF, porém pode ocorrer, por vezes, degradação do RNA presente na amostra (Sykes 2013). Esta degradação do material genético pode assim justificar a impossibilidade de deteção das mutações neste caso, mas também no anterior.

12.16. Correlação entre as formas clínicas e a mutação detetada por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação

As diferenças genéticas entre os biótipos FECV e FIPV determinam o tipo de resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, a forma clínica da doença (Pedersen 2014). Posto isto, a forma efusiva resulta do falhanço do sistema imunitário na montagem de uma resposta imunitária celular eficaz, ocorrendo uma resposta predominante de células B, enquanto a forma seca resulta de um estadio intermédio em que existe uma resposta imunitária do tipo celular parcialmente eficaz (Pedersen 2014). Sabe-se que a proteína S é um dos principais epitopos do FCoV, particularmente na região onde ocorrem as mutações estudadas no presente trabalho (Lewis et al. 2015), sendo esta considerada uma das proteínas estruturais mais importantes na patogénese deste agente (Jaimes and Whittaker 2018). Partindo destes pressupostos, o principal objetivo desta análise consiste em perceber o possível papel clínico que estas mutações assumem na PIF, avaliando se

existe realmente diferença na resposta imunitária desenvolvida pelo hospedeiro, a qual se irá traduzir numa apresentação clínica específica. Segundo o nosso conhecimento não existe, até à data, qualquer outra pesquisa no sentido de perceber este possível papel clínico destas mutações na PIF, sendo o presente estudo pioneiro na abordagem deste tema.

Os felídeos, nos quais foi detetada a mutação S1060A, apenas apresentaram casos de forma efusiva da doença, enquanto nos restantes animais foram observados casos de todas as 3 formas clínicas (efusiva, seca e mista). Contudo, o valor de p obtido (0,3) é superior a 0,05 revelando que a possível associação entre a presença de mutação S1060A e a forma efusiva da doença é atribuída ao acaso. Este valor é em grande parte influenciado pelo pequeno número de casos incluídos nesta análise, o qual representa a maior limitação deste estudo, como referido anteriormente. Todavia, não podemos ignorar o facto de que a totalidade dos animais ($n=3$, 100%) em que esta mutação está presente exibiu unicamente a forma efusiva da doença, razão pela qual seria relevante a repetição deste estudo a larga escala.

12.17. Análise de sobrevivência

A probabilidade de sobrevivência observada neste estudo, após 22 dias do início do quadro clínico, foi de menos de 50%, reduzindo-se drasticamente para apenas 25% após aproximadamente 2 meses (59 dias). Estes dados revelam a natureza invariavelmente fatal, bem como a rapidez de progressão da doença.

Sabe-se que os animais que desenvolvem forma efusiva frequentemente morrem dentro de algumas semanas, enquanto os animais com forma não efusiva podem resistir por alguns meses (Greene 2011, Sykes 2013). Esta afirmação está de acordo com o observado na nossa análise, à excepção de 2 casos com forma húmida da doença, correspondendo estes felídeos a 2 das 3 observações censuradas do gráfico 16. Um dos felídeos apresentou um tempo de sobrevida de 302 dias, desde o início do quadro clínico até à morte, e o outro um tempo de sobrevida de 118 dias, desde o início do quadro clínico até à data de realização da presente análise, visto ainda se encontrar vivo. Este tempo de sobrevivência mais prolongado pode assim ser justificado pela terapêutica instituída nestes dois animais, visto terem ambos realizado tratamento com um fármaco externo, um com recurso a GS-441524 e o outro com um fármaco semelhante (GS-441524 ou GC376), o qual não foi possível determinar. Estes fármacos, segundo pesquisas recentes, são ambos dotados de grande eficácia no controlo da PIF, contribuindo assim para uma qualidade de vida mais duradoura nestes animais (Pedersen et al. 2018, Pedersen et al. 2019), tendo sido reportadas taxas de cura na ordem dos 33% e tempos de sobrevivência superiores a 1 ano, em alguns felídeos em tratamento (Yin et al. 2021).

Além disso, foi elaborada uma análise de sobrevivência separadamente, avaliando

cada uma das formas clínicas da doença (gráfico 17 e tabela 4 em anexos), identificando-se tempos médios de sobrevivência de 19, 27 e 37 dias para as formas efusiva, seca e mista, respetivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por uma pesquisa realizada em Taiwan (Tsai et al. 2011), com excepção das formas seca e mista, particularmente nesta última, na qual a discrepância de valores foi mais acentuada, tendo os autores obtido aproximadamente 111 dias de sobrevida. Esta diferença pode ser justificada por dois motivos distintos, um relativo ao tamanho da amostragem e outro a crenças religiosas. O nosso estudo, apesar de ter sido realizado por um período de tempo mais alargado, abrangeu menor número de casos, razão pela qual os resultados possam ser menos representativos. Por outro lado, muitos dos felídeos no presente trabalho foram submetidos a eutanásia, enquanto em Taiwan este procedimento não é frequentemente aceite por motivos de ordem religiosa (Tsai et al. 2011), podendo assim contribuir para esta discrepância de valores.

13. Limitações do estudo

O presente trabalho constitui um estudo descritivo que acarreta algumas limitações, nomeadamente a pequena amostragem, a qual corresponde à principal limitação aquando da realização das análises presentes nesta investigação.

As principais limitações do presente trabalho, no que respeita aos dados recolhidos, prendem-se maioritariamente com o desconhecimento e/ou a falta de rigor na transmissão de informações pelos tutores dos animais, bem como toda a informação referente à anamnese e história clínica dos pacientes por falta de um formulário padronizado de preenchimento destes dados. Posto isto, existem alguns campos de análise com informação desconhecida como é o caso da origem, estilo de vida e número de felídeos coabitantes dos pacientes em estudo.

14. Conclusão

O presente estudo procedeu à caracterização dos felídeos com PIF, seguidos na UICB da FMV-UL, com o objetivo de identificar a relação existente entre a forma clínica de PIF apresentada e as mutações virais detetadas por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação. Neste trabalho, foi ainda realizada a caracterização geral de cada uma das formas clínicas e a análise de sobrevivência da população-alvo.

Os resultados desta pesquisa identificaram assim a forma húmida, como sendo a forma clínica mais comum de PIF, possivelmente associada à dificuldade de diagnóstico da forma seca, correspondendo a ascite e o derrame pleural aos derrames cavitários observados na maioria dos animais. Relativamente ao quadro clínico, observou-se que as alterações oculares e neurológicas são mais frequentemente associadas às formas seca e mista da doença, sendo os sinais clínicos mais comuns a uveíte e ataxia, respetivamente.

A análise de sobrevivência desta população demonstrou que aproximadamente 75% dos felídeos presentes neste estudo faleceu ou foi eutanasiado em média após 59 dias do início dos sinais clínicos, revelando assim a natureza fatal e rápida progressão da PIF. A sobrevivência das diferentes formas clínicas foi também avaliada, porém não se verificaram diferenças significativas nos tempos de sobrevivência entre elas. Dos 23 felídeos presentes neste estudo, 2 destacaram-se devido ao elevado tempo de sobrevivência que apresentaram, estando ambos sob terapêutica com fármacos como a GS-441524 e a GC376. Este achado veio assim fornecer suporte adicional às pesquisas recentes que defendem a eficácia destes dois fármacos no tratamento de PIF (Pedersen et al. 2018, Pedersen et al. 2019).

No presente trabalho, foi detetada a presença da mutação M1058L na totalidade dos felídeos avaliados por RT-PCR em tempo real com pirosequenciação, sendo a mutação S1060A detetada em apenas 3 dos 12 gatos submetidos a análise. O resultado mais interessante desta investigação corresponde ao facto de que todos os gatos com presença de mutação S1060A apresentaram forma húmida da doença, apesar da relação entre a presença da referida mutação e da forma húmida não se ter mostrado estatisticamente significativa. Todavia, esta falta de significância estatística deve-se, em grande parte, à pequena amostragem, fator que constitui a principal limitação da presente investigação. Posto isto, podemos concluir que é de extrema relevância a repetição desta análise numa amostra mais representativa da população, a fim de identificar se esta relação entre a presença de mutação S1060A e a forma efusiva de PIF realmente existe.

15. Bibliografia

Aboubakr HA, Sharafeldin TA, Goyal SM. 2020. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transbound Emerg Dis.* 68(june):1–17. doi:10.1111/tbed.13707.

Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, et al. 2009. Feline infectious peritonitis ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* doi:10.1016/j.jfms.2009.05.008.

Addie D, Houe L, Maitland K, Passantino G, Decaro N. 2020. Effect of cat litters on feline coronavirus infection of cell culture and cats. *J Feline Med Surg.* 22(4):350–357. doi:10.1177/1098612X19848167.

Addie DD. 2019. Feline infectious peritonitis: answers to frequently asked questions concerning FIP and coronavirus. *Vet Nurs J.* 34(8):201–206. doi:10.1080/17415349.2019.1629366.

Addie DD. 2008. Feline Infectious Peritonitis. In: *Veterinary Interferon Handbook*. 2nd ed. Cros, France. Virbac SA. p. 132-146

Addie DD, Jarrett O. 2001. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec.* 148(21):649–653. doi:10.1136/vr.148.21.649.

André NM, Miller AD, Whittaker GR. 2020. Feline infectious peritonitis virus-associated rhinitis in a cat. *J Feline Med Surg Open Reports.* 6(1). doi:10.1177/2055116920930582.

Aydin H, Yildirim S. 2019. Investigation of the relation between feline infectious peritonitis and retroviruses in cats. *GSC Biol Pharm Sci.* 6(2):071–078. doi:10.30574/gscbps.2019.6.2.0011.

Bank-Wolf BR, Stallkamp I, Wiese S, Moritz A, Tekes G, Thiel HJ. 2014. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 173(3–4):177–188. doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.020.

Barker E, Tasker S. 2020. Update on feline infectious peritonitis. In *Pract.* 42(7):372–383. doi:10.1136/inp.m3187.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. 2009. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis.* 15(9):1445–1452. doi:10.3201/eid1509.081573.

Cave TA, Golder MC, Simpson J, Addie DD. 2004. Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. In: *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Vol. 6. p. 53–58.

Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJM. 2012. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis.* 18(7):1089–1095. doi:10.3201/eid1807.120143.

Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJM. 2010. Feline infectious peritonitis: Insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 91(2):415–420. doi:10.1099/vir.0.016485-0.

Crawford AH, Stoll AL, Sanchez-Masian D, Shea A, Michaels J, Fraser AR, Beltran E. 2017.

Clinicopathologic Features and Magnetic Resonance Imaging Findings in 24 Cats With Histopathologically Confirmed Neurologic Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Intern Med.* 31(5):1477–1486. doi:10.1111/jvim.14791.

Das S, Ramachandran AK, Birangal SR, Akbar S, Ahmed B, Joseph A. 2021. The controversial therapeutic journey of chloroquine and hydroxychloroquine in the battle against SARS-CoV-2: A comprehensive review. *Med Drug Discov.* 10. doi:10.1016/j.medidd.2021.100085.

Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Olyslaegers DAJ, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. 2013. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol.* 162(2–4):447–455. doi:10.1016/j.vetmic.2012.10.032.

Doki T, Toda M, Hasegawa N, Hohdatsu T, Takano T. 2020. Therapeutic effect of an anti-human-TNF-alpha antibody and itraconazole on feline infectious peritonitis. *Arch Virol.* 165(5):1197–1206. doi:10.1007/s00705-020-04605-7.

Drechsler Y, Alcaraz A, Bossong FJ, Collisson EW, Diniz PPVP. 2011. Feline Coronavirus in Multicat Environments. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 41(6):1133–1169. doi:10.1016/j.cvsm.2011.08.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.08.004>.

Emmler L, Felten S, Matiasek K, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger C, Hartmann K. 2020. Feline coronavirus with and without spike gene mutations detected by real-time RT-PCRs in cats with feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 22(8):791–799. doi:10.1177/1098612X19886671.

Ettinger S, Feldman E, Coté E. 2017. Chronic Kidney Disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and the Cat.* 8th ed. Elsevier Inc. p. 4694.

Felten S, Hartmann K. 2019. Diagnosis of feline infectious peritonitis: A review of the current literature. *Viruses.* 11(11). doi:10.3390/v11111068.

Ferreira A, Marwood R, Batchelor D, Maddox T, Mortier JR. 2020. Prevalence and clinical significance of the medullary rim sign identified on ultrasound of feline kidneys. *Vet Rec.* 186(16):533. doi:10.1136/vr.105619.

Fischer Y, Ritz S, Weber K, Sauter-Louis C, Hartmann K. 2011. Randomized, Placebo Controlled Study of the Effect of Propentofylline on Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Intern Med.* 25(6):1270–1276. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00806.x.

Forrester SD, Towell TL. 2015. Feline Idiopathic Cystitis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 45(4):783–806. doi:10.1016/j.cvsm.2015.02.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.02.007>.

Greene CE. 2011. Feline coronavirus infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. Missouri: Elsevier Inc. p. 92–108.

Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. 1998. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 62(3):193–205. doi:10.1016/S0378-1135(98)00210-7.

Heeney JL, Evermann JF, McKeirnan AJ, Marker-Kraus L, Roelke ME, Bush M, Wildt DE, Meltzer DG, Colly L, Lukas J. 1990. Prevalence and implications of feline coronavirus infections of captive and free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *J Virol.* 64(5):1964–1972.

doi:10.1128/jvi.64.5.1964-1972.1990.

HORHOGEA C, LAIU I, MĂCIUCĂ I, RÎMBU C, CARP-CĂRARE M. 2011. Feline Infectious Peritonitis: Clinical and Anatomopathological Aspects. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca - Vet Med.* 68(68):159–164. doi:10.15835/buasvmcn-vm:2:68:6892.

Ishida T, Shibanaï A, Tanaka S, Uchida K, Mochizuki M. 2004. Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 6(2):107–109. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.011.

Izes AM, Yu J, Norris JM, Govendir M. 2020. Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats. *Vet Q.* 40(1):322–330. doi:10.1080/01652176.2020.1845917.

Jaimes JA, Whittaker GR. 2018. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology.* 517:108–121. doi:10.1016/j.virol.2017.12.027.

Kennedy M, Boedeker N, Gibbs P, Kania S. 2001. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 81(3):227–234. doi:10.1016/S0378-1135(01)00354-6.

Kipar A, Meli ML. 2014. Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma? *Vet Pathol.* 51(2):505–526. doi:10.1177/0300985814522077.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. 2010. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol.* 91(7):1698–1707. doi:10.1099/vir.0.020214-0.

Kipar A, Meli ML, Failing K, Euler T, Gomes-Keller MA, Schwartz D, Lutz H, Reinacher M. 2006. Natural feline coronavirus infection: Differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 112(3–4):141–155. doi:10.1016/j.vetimm.2006.02.004.

Lewis CS, Porter E, Matthews D, Kipar A, Tasker S, Helps CR, Siddell SG. 2015. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J Gen Virol.* 96:1358–1368. doi:10.1099/vir.0.000084.

Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, Whittaker GR. 2013. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis.* 19(7):1066–1073. doi:10.3201/eid1907.121094.

Lin CN, Su BL, Huang HP, Lee JJ, Hsieh MW, Chueh LL. 2009. Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 11(6):413–419. doi:10.1016/j.jfms.2008.09.004.

Luria BJ, Levy JK, Lappin MR, Breitschwerdt EB, Legendre AM, Hernandez JA, Gorman SP, Lee IT. 2004. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J Feline Med Surg.* 6(5):287–296. doi:10.1016/j.jfms.2003.11.005.

Malbon AJ, Russo G, Burgener C, Barker EN, Meli ML, Tasker S, Kipar A. 2020. The effect of natural feline coronavirus infection on the host immune response: A whole-transcriptome analysis of the mesenteric lymph nodes in cats with and without feline infectious peritonitis. *Pathogens.* 9(7):1–19. doi:10.3390/pathogens9070524.

Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. 2005. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust Vet J.* 83(11):666–673. doi:10.1111/j.1751-0813.2005.tb13044.x.

- Oguma K, Ohno M, Yoshida M, Sentsui H. 2018. Mutation of the S and 3c genes in genomes of feline coronaviruses. *J Vet Med Sci.* 80(7):1094–1100. doi:10.1292/jvms.17-0704.
- Pedersen NC. 2009. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg.* 11(4):225–258. doi:10.1016/j.jfms.2008.09.008.
- Pedersen NC. 2014. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. *Vet J.* 201(2):123–132. doi:10.1016/j.tvjl.2014.04.017.
- Pedersen NC, Allen CE, Lyons LA. 2008. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg.* 10(6):529–541. doi:10.1016/j.jfms.2008.02.006.
- Pedersen NC, Kim Y, Liu H, Galasiti Kankanamalage AC, Eckstrand C, Groutas WC, Bannasch M, Meadows JM, Chang KO. 2018. Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 20(4):378–392. doi:10.1177/1098612X17729626.
- Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. 2012. Feline infectious peritonitis: Role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res.* 165(1):17–28. doi:10.1016/j.virusres.2011.12.020.
- Pedersen NC, Perron M, Bannasch M, Montgomery E, Murakami E, Liepnieks M, Liu H. 2019. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 21(4):271–281. doi:10.1177/1098612X19825701.
- Pesteanu-Somogyi LD, Radzai C, Pressler BM. 2006. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *J Feline Med Surg.* 8(1):1–5. doi:10.1016/j.jfms.2005.04.003.
- Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* 34(12):3180–3184. doi:10.1128/jcm.34.12.3180-3184.1996.
- Porter E, Tasker S, Day MJ, Harley R, Kipar A, Siddell SG, Helps CR. 2014. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res.* 45(1). doi:10.1186/1297-9716-45-49.
- Reynolds BS, Lefebvre HP. 2013. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors - what do we know? *J Feline Med Surg.* 15(1 SUPPL.):3–14. doi:10.1177/1098612X13495234.
- Riemer F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. 2016. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). *J Feline Med Surg.* 18(4):348–356. doi:10.1177/1098612X15586209.
- Ritz S, Egberink H, Hartmann K. 2007. Effect of Feline Interferon-Omega on the Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis. *J Vet Intern Med.* 21(6):1193–1197. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb01937.x.
- Rottier PJM, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. 2005. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. *J Virol.* 79(22):14122–14130. doi:10.1128/jvi.79.22.14122-14130.2005.

Sangl L, Matiasek K, Felten S, Gründl S, Bergmann M, Balzer HJ, Pantchev N, Leutenegger CM, Hartmann K. 2019. Detection of feline coronavirus mutations in paraffin-embedded tissues in cats with feline infectious peritonitis and controls. *J Feline Med Surg.* 21(2):133–142. doi:10.1177/1098612X18762883.

Studer N, Lutz H, Saegerman C, Gönczi E, Meli ML, Boo G, Hartmann K, Hosie MJ, Moestl K, Tasker S, et al. 2019. Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection - Reported by the european advisory board on cat diseases (ABCD Europe). *Viruses.* 11(11). doi:10.3390/v11110993. [accessed 2020 Dec 17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893802/>.

Sykes JE. 2013. Feline coronavirus infection. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1st ed. Missouri: Elsevier Inc. p. 195–208.

Takano T, Azuma N, Hashida Y, Satoh R, Hohdatsu T. 2009. B-cell activation in cats with feline infectious peritonitis (FIP) by FIP-virus-induced B-cell differentiation/survival factors. *Arch Virol.* 154(1):27–35. doi:10.1007/s00705-008-0265-9.

Takano T, Satoh K, Doki T, Tanabe T, Hohdatsu T. 2020. Antiviral effects of hydroxychloroquine and type I interferon on in vitro fatal feline coronavirus infection. *Viruses.* 12(5). doi:10.3390/v12050576.

Tasker S. 2018. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. *J Feline Med Surg.* 20(3):228–243. doi:10.1177/1098612X18758592.

Tekes G, Spies D, Bank-Wolf B, Thiel V, Thiel H-J. 2012. A Reverse Genetics Approach To Study Feline Infectious Peritonitis. *J Virol.* 86(12):6994–6998. doi:10.1128/jvi.00023-12.

Tekes G, Thiel HJ. 2016. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. In: *Advances in Virus Research*. Vol. 96. p. 193–218.

Terada Y, Matsui N, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Soma T, Mochizuki M, Maeda K. 2014. Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One.* 9(9). doi:10.1371/journal.pone.0106534.

Tsai HY, Chueh LL, Lin CN, Su BL. 2011. Clinicopathological findings and disease staging of feline infectious peritonitis: 51 cases from 2003 to 2009 in Taiwan. *J Feline Med Surg.* 13(2):74–80. doi:10.1016/j.jfms.2010.09.014.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 243(1):150–157. doi:10.1006/viro.1998.9045.

Whittaker GR, André NM, Millet JK. 2018. Improving Virus Taxonomy by Recontextualizing Sequence-Based Classification with Biologically Relevant Data: the Case of the Alphacoronavirus 1 Species. *mSphere.* 3(1). doi:10.1128/mspheredirect.00463-17.

Worthing KA, Wigney DI, Dhand NK, Fawcett A, McDonagh P, Malik R, Norris JM. 2012. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *J Feline Med Surg.* 14(6):405–412. doi:10.1177/1098612X12441875.

Yin Y, Li T, Wang C, Liu X, Ouyang H, Ji W, Liu J, Liao X, Li J, Hu C. 2021. A retrospective study of clinical and laboratory features and treatment on cats highly suspected of feline infectious peritonitis in Wuhan, China. *Sci Rep.* 11(1). doi:10.1038/s41598-021-84754-0.

16. Anexos

6 observations deleted due to missingness

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower	95% CI upper	95% CI
3	23	1	0.9565	0.0425	0.8767	1.000	
4	22	1	0.9130	0.0588	0.8049	1.000	
10	21	1	0.8696	0.0702	0.7423	1.000	
11	20	2	0.7826	0.0860	0.6310	0.971	
13	18	1	0.7391	0.0916	0.5798	0.942	
16	17	2	0.6522	0.0993	0.4839	0.879	
18	15	1	0.6087	0.1018	0.4386	0.845	
19	14	1	0.5652	0.1034	0.3950	0.809	
20	13	1	0.5217	0.1042	0.3528	0.772	
22	12	1	0.4783	0.1042	0.3121	0.733	
24	11	1	0.4348	0.1034	0.2728	0.693	
27	10	1	0.3913	0.1018	0.2350	0.651	
37	9	1	0.3478	0.0993	0.1988	0.609	
53	7	1	0.2981	0.0968	0.1578	0.563	
59	6	1	0.2484	0.0925	0.1197	0.515	
107	5	1	0.1988	0.0863	0.0848	0.466	
136	3	1	0.1325	0.0790	0.0412	0.426	
203	2	1	0.0663	0.0613	0.0108	0.406	

Tabela 3. Tabela de sobrevivência referente ao gráfico 16

6 observations deleted due to missingness

FORMA.CLINICA=EFUSIVA

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower	95% CI upper	95% CI
4	13	1	0.923	0.0739	0.7890	1.000	
10	12	1	0.846	0.1001	0.6711	1.000	
11	11	1	0.769	0.1169	0.5711	1.000	
16	10	2	0.615	0.1349	0.4004	0.946	
18	8	1	0.538	0.1383	0.3255	0.891	
19	7	1	0.462	0.1383	0.2566	0.830	
20	6	1	0.385	0.1349	0.1934	0.765	
24	5	1	0.308	0.1280	0.1361	0.695	
53	3	1	0.205	0.1196	0.0654	0.643	

FORMA.CLINICA=MISTA

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower	95% CI upper	95% CI
13	5	1	0.8	0.179	0.5161	1	
22	4	1	0.6	0.219	0.2933	1	
37	3	1	0.4	0.219	0.1367	1	
59	2	1	0.2	0.179	0.0346	1	
136	1	1	0.0	NaN	NA	NA	

FORMA.CLINICA=SECA

time	n.risk	n.event	survival	std.err	lower	95% CI upper	95% CI
3	5	1	0.8	0.179	0.5161	1	
11	4	1	0.6	0.219	0.2933	1	
27	3	1	0.4	0.219	0.1367	1	
107	2	1	0.2	0.179	0.0346	1	
203	1	1	0.0	NaN	NA	NA	

Tabela 4. Tabela de sobrevivência referente ao gráfico 17