

**ALEXANDRE GONÇALVES TEIXEIRA DANIEL**

Avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+ e da razão  
CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite  
crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou calicivírus

São Paulo

2010

**ALEXANDRE GONÇALVES TEIXEIRA DANIEL**

Avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de Concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2390  
FMVZ

Daniel, Alexandre Gonçalves Teixeira

Avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus / Alexandre Gonçalves Teixeira Daniel. -- 2010.

76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.  
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior.

1. Gengivite. 2. Maine Coon. 3. Herpesvírus tipo 1. 4. Calicivírus.  
5. Linfócitos. I. Título.

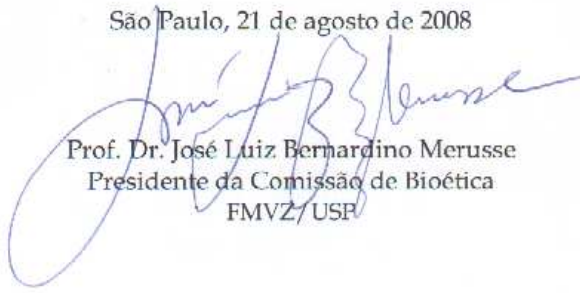


## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos níveis de linfócitos TCD4+, CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus", protocolado sob o nº1445/2008, utilizando 80 (oitenta) gatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Evaluation of CD4+ and CD8+ T-Lymphocyte counting, CD4+:CD8+ ratio in Maine Coon cats with chronic gingivitis, infected or not by feline herpesvirus type 1 and calicivirus", utilizing 80 (eighty) cats, protocol number 1445/2008, under the responsibility Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

  
Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nome:** DANIEL, Alexandre Gonçalves Teixeira

**Título:** Avaliação dos níveis de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

"Sempre que houver alternativas tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as conseqüências." (Osho)

"Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado." (Albert Einstein)

"Na dificuldade encontra-se a oportunidade." (Albert Einstein)

"Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é conseqüência." (Albert Einstein)

"Viver é como andar de bicicleta: é preciso avançar para não perder o equilíbrio."  
(Albert Einstein)

"A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras." (Albert Einstein)

"Limitações são criadas apenas pela nossa mente." (provérbio chinês).

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Eliana** e **Douglas**, dedico muito, senão tudo. Mesmo com todas as intempéries que a vida nos submete, mesmo com todas as reviravoltas ocorridas, vocês nunca deixaram de me apoiar. A família é a base de tudo, e graças a vocês, estou onde estou. Obrigado por tudo!

Ao meu irmão, **Rafael**, por sempre acreditar e fortalecer minha vontade em aprender mais; por mais absurdas que pudessem ser diversas situações vividas, em se tratando de fazer o bem a um animal, este estava sempre ao meu lado, como um fiel escudeiro.

A minha esposa **Arine**. Minha amiga, companheira, namorada e mulher. Meu porto seguro, onde sempre encontro amparo e carinho. Sem você, não teria sido tão bom, não teria graça. Realmente, nada é por acaso.

A todos os gatos, por despertarem em minha pessoa um fantástico desejo de aprender cada dia mais. Não somente por vocês, mas também com vocês, aprendo a cada dia que passa algo novo.

A Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior, pela oportunidade na realização deste trabalho. Obrigado por toda paciência, compreensão, confiança, conselhos e, sobretudo, pela orientação. Não somente pela orientação neste trabalho, mas por me orientar em toda minha trajetória profissional, desde a graduação. Você será sempre um grande ícone e exemplo a ser seguido!

A Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, pela amizade, aprendizado e conselhos.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica Carlos Eduardo Larsson, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Márcia Mery Kogika, Denise Saretta Schwartz, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Fernando José Benesi, Wilson Roberto Fernandes, Alice M. M. P. Della Libera e Maria Cláudia Araripe Sucupira, por toda ajuda e ensinamentos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo aceite no programa de Pós Graduação em Clínica Veterinária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado (processo n. 2008/55892-5) e Auxílio à Pesquisa (processo n. 2007/51221-6), que viabilizaram a realização deste estudo.

À M.V., PhD. Janaína M. Monteiro e a M.V. PhD Rosemary Viola Bosch, pela ajuda inestimável com o citômetro e auxílio na realização dos exames de citometria de fluxo.

As “meninas” do laboratório Maria Luisa Franchini, Maria Helena Pelissari, Edna Santana dos Santos e Samantha Yve Myashiro, por toda a amizade.



Ao corpo de médicos veterinários contratados dos serviços de Clínica Médica e Pronto Atendimento Médico Khadine Kazue Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Bruna Maria Pereira Coelho, Paula Romy Gonçalves Monteiro e Vera A. B. Fortunato Wirthl, por todo companheirismo e ajuda.

Aos enfermeiros Antonio Carlos Malaquias, Carlito dos Santos Belau, Geraldo Natalino Thezi e Milton Gregório dos Santos, por toda ajuda em coletas e em atividades no HOVET.

Aos companheiros de pós graduação Andreza Ávila, Arine Pellegrino, Roberta Alencar de Oliveira, Camila Ferreiro, Rodrigo Ubukata, Camila Domingues, Thaís Rodrigues Macedo, Paula Hiromi Itikawa, Francisco Ferreira Lima Júnior, Ângela Yazbek, Simoni Maruyama, Cláudio N. Rossi, Christiane Prosser, Daniele Passarelli, Patrícia Chamas, Valéria Marinho Oliveira, Patrícia Erdmann, Adriana Siqueira, Ariane Marques Mazini, Priscylla Ramos Rosa, Fabrício Lorenzini, Bruno M. Teixeira, Priscila Fragoso e Luiz Eduardo Lucarts, pela amizade, incentivo e companheirismo.

Em especial, a companheira e amiga de pós graduação, além de grande amiga, Daniela Ramos, pela paciência e oportunidade de convivência. Pelas longas conversas, desabafos e conselhos. Por todo o incentivo e serenidade, você foi muito importante nesta conquista!

A criadora de Maine Coons e amiga Leila Cristina Andrade, pelo apoio e disposição em autorizar a coleta de material de todos os animais do seu gatil.

Aos criadores filiados a AMACOON, por colaborarem nesta pesquisa.

A secretária de pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São

Paulo, Adelaide Fátima de Jesus Borges, pela paciência e ajuda prestada no decorrer do curso.

As secretárias do Departamento de Clínica Médica Maria Aparecida de Freitas, Silvana Rossi Guedes e Carolina Arais Aroma, por toda ajuda e disponibilidade.

A Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela revisão deste documento.

A todos que ajudaram e torceram pela conclusão deste trabalho.

A Deus.

## RESUMO

DANIEL, A. G. T. **Avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+, T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus.** [Evaluation of CD4+ and CD8+ T-Lymphocytes count and CD4+:CD8+ ratio in Maine Coon cats with chronic gingivitis and infected or not by herpesvirus type 1 and/or calicivirus]. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Sabe-se que um dos principais problemas odontológicos na clínica de felinos é a gengivite crônica e intratável. Tal afecção pode ser iniciada e/ou exacerbada por agentes virais, como o vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV), o Herpesvírus tipo 1 e o Calicivírus. Os gatos da raça Maine Coon apresentam grande predisposição ao desenvolvimento de gengivite-estomatite juvenil e intratável. A depleção de linfócitos T CD4+ e T CD8+ pode exercer papel determinante na iniciação e manutenção das doenças inflamatórias da gengiva. O escopo do presente estudo foi verificar se os animais da raça Maine Coon são mais predispostos à calicivirose, bem como avaliar quantitativamente a resposta imunológica celular, mediada por linfócitos TCD4+ e TCD8+, visando a correlacionar à influência do número de linfócitos na presença e curso da gengivite nesta determinada raça, utilizando-se como controle gatos de outras raças com e sem gengivite. Os valores absolutos médios de linfócitos totais em Maine Coons com gengivite crônica mostraram-se inferiores aos de gatos da raça Maine Coon sem doença oral e de gatos de outras raças com gengivite crônica ( $p < 0,05$ ); os valores médios de linfócitos TCD4+ em Maine Coons com gengivite crônica mostraram-se inferiores quando comparados aos valores de animais da mesma raça, sem doença oral instalada ( $p < 0,05$ ); animais da raça Maine Coon possuem menor relação CD4+:CD8+ quando comparados a animais de outras raças com gengivite crônica e também quando comparados a Maine Coons sem doença oral ( $p < 0,05$ ). O calicivírus está altamente relacionado à ocorrência da gengivite, independentemente da raça estudada, não havendo maior prevalência na raça Maine Coon. O efeito do calicivírus não foi significativo nas alterações de nenhuma das variáveis celulares estudadas. Tais fatos apontam para uma possível predisposição racial ao quadro

inflamatório gengival, com alteração de alguns componentes celulares relacionados à imunidade celular. Isto tem como fator importante alertar o clínico frente ao uso de glicocorticóides no tratamento da gengivite crônica nesta raça, visando a evitar maior comprometimento da imunidade celular destes animais.

Palavras-chave: Gengivite. Maine Coon. Herpesvírus tipo 1. Calicivírus. Linfócitos.

## ABSTRACT

DANIEL, A. G. T. **Evaluation of CD4+ and CD8+ T-Lymphocytes count and CD4+:CD8+ ratio in Maine Coon cats with chronic gingivitis and infected or not with herpesvirus type 1 and/or calicivirus** [Avaliação dos níveis de linfócitos T CD4+, CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos da raça Maine Coon com gengivite crônica e infectados ou não pelo Herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus]. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Chronic untreatable feline gingivitis is widely recognized as one of the major oral diseases seen in feline patients. It can be either triggered or exacerbated by virus such as feline immunodeficiency virus, feline herpesvirus type 1 and calicivirus. One may therefore propose that lymphocytes T CD4+ and T CD8+ depletion can play an important role in initiating and maintaining the inflammatory gingival disease. Maine Coon cats are highly predisposed to juvenile untreatable gingivitis. The purpose of this study was to evaluate whether Maine Coon cats are more predisposed to calicivirus infection and to verify, quantitatively, their immunological cellular response mediated by lymphocytes T CD4+ and TCD8+. The main idea was to investigate the influence imposed by lymphocyte counts in gingivitis development and progression within this breed; for this, we selected non-Maine Coon cats (with and without gingivitis) to serve as controls. Mean absolute values of total lymphocytes in Maine Coon cats presented with gingivitis were inferior than the same values taken for both Maine Coon cats free of oral disease and non-Maine Coon cats with chronic gingivitis ( $p < 0,05$ ); lymphocytes TCD4+ average values in Maine Coon cats with chronic gingivitis were also lower than the ones taken from cats of the same breed but without oral disease ( $p < 0,05$ ). Maine Coon cats have lower CD4+:CD8+ ratio when compared to non-Maine Coon cats with chronic gingivitis as well as with Maine Coon cats without oral disease ( $p < 0,05$ ). The calicivirus is highly involved with the occurrence of gingivitis, no matter the breed being evaluated. The action virus imposes in changing cellular immunology was not significant, at least considering the cellular variables studied. All these lead us to point out a possible breed predisposition to the

gingival inflammation, with modification of some cellular components related with cellular immunity. Furthermore, concerning practical terms, these results serve as a relevant alert to the clinicians regarding the use of glucocorticoids for treating chronic gingivitis in this breed, in order to prevent further impairment of cellular immunity of these animals.

Keywords: Gingivitis. Maine Coon. Herpesvirus type 1. Calicivirus. Lymphocytes.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição de frequências da gengivite segundo a identificação do FCV na cavidade oral, São Paulo, 2010.....	39
Tabela 2 -	Distribuição das frequências do FCV segundo os grupos com gengivite crônica, São Paulo, 2010.....	40
Tabela 3 -	Estimativas das razões de chances de desenvolver gengivite, São Paulo, 2010.....	40
Tabela 4 -	Probabilidades estimadas de desenvolver gengivite, São Paulo, 2010.....	40
Tabela 5 -	Medidas Descritivas da concentração de linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	42
Tabela 6 -	Medidas Descritivas da concentração de linfócitos T CD4+ segundo grupo, FCV e gengivite, separadamente, São Paulo, 2010.....	43
Tabela 7 -	Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{CD4})$ com os fatores grupo, FCV e gengivite. – Estudo das interações, São Paulo, 2010.....	45
Tabela 8 -	Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{CD4+})$ com o fator FCV e a interação entre Grupo e gengivite, São Paulo, 2010.....	46
Tabela 9 -	Medidas Descritivas da concentração de linfócitos T CD8+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	47
Tabela 10 -	Medidas descritivas da concentração de linfócitos T CD8+ segundo grupo, FCV e gengivite, separadamente, São Paulo, 2010.....	48
Tabela 11 -	Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{CD8+})$ com os fatores grupo, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	50
Tabela 12 -	Medidas descritivas da relação CD4+:CD8+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	52
Tabela 13 -	Medidas descritivas da relação CD4+:CD8+ segundo cada fator separadamente, São Paulo, 2010.....	53

Tabela 14 - Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{CD4+}:\text{CD8+})$ com os fatores grupo, FCV e gengivite – Estudo das interações, São Paulo, 2010.....	55
Tabela 15 - Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{CD4+}:\text{CD8+})$ com o fator FCV e a interação entre grupo e gengivite, São Paulo, 2010.....	56
Tabela 16 - Medidas descritivas da concentração de linfócitos T CD8+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	57
Tabela 17 - Medidas descritivas da concentração de linfócitos totais segundo grupo, FCV e gengivite, separadamente, São Paulo, 2010.....	58
Tabela 18 - Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{linfócitos Totais})$ com os fatores grupo, FCV e Gengivite. – Estudo das interações, São Paulo, 2010.....	60
Tabela 19 - Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o $\log_{10}(\text{linfócitos Totais})$ com os fatores FCV e a interação entre grupo e gengivite, São Paulo, 2010.....	61



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo grupo, São Paulo, 2010.....	44
Gráfico 2 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo FCV, São Paulo, 2010.....	44
Gráfico 3 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo gengivite, São Paulo, 2010.....	45
Gráfico 4 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo grupo, São Paulo, 2010.....	49
Gráfico 5 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo FCV, São Paulo, 2010.....	49
Gráfico 6 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo gengivite, São Paulo, 2010.....	50
Gráfico 7 -	Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo grupo, São Paulo, 2010.....	54
Gráfico 8 -	Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo FCV, São Paulo, 2010.....	54
Gráfico 9 -	Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo gengivite, São Paulo, 2010.....	55
Gráfico 10 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo grupo, São Paulo, 2010.....	59
Gráfico 11 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo FCV, São Paulo, 2010.....	59
Gráfico 12 -	Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo gengivite, São Paulo, 2010.....	60

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Imagem da mucosa oral de um gato da raça Maine Coon apresentando gengivite grau 3. Notar hiperemia em região de fauces e início de ulceração – São Paulo – 2010.....	75
APÊNDICE B -	Imagem da mucosa oral de um gato da raça Maine Coon apresentando gengivite grau 2. Notar hiperemia moderada em toda região gengival, principalmente na área correspondente ao dente canino – São Paulo – 2010 .....	75
APÊNDICE C -	Imagem da cavidade oral de um gato da raça Maine Coon com gengivite grau 4. Animal com hiperemia, hiperplasia e ulceração gengival, com acometimento concomitante da região das fauces – São Paulo – 2010	76
APÊNDICE D -	Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE C. Notar intensa hiperemia e hiperplasia gengival, bem como estria de material purulento – São Paulo – 2010.....	76

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	ANIMAIS.....	31
3.2	EXAMES LABORATORIAIS.....	31
3.2.1	<b>Reação de polimerização e cadeia (PCR) para o vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV)</b> .....	31
3.2.2	<b>Imunofluorescência para detecção do vírus da leucemia felina (FeLV)</b> ..	32
3.2.3	<b>Reação de polimerização em cadeia para o calicivírus felino (FCV) e herpesvírus felino tipo 1 (FHV – 1)</b> .....	32
3.2.3.1	Calicivírus felino (FCV).....	33
3.2.3.1.1	<i>Extração de RNA</i> .....	33
3.2.3.1.2	<i>Transcrição reversa (síntese de cDNA, DNA complementar)</i> .....	33
3.2.3.1.3	<i>Reação de polimerização em cadeia (PCR)</i> .....	33
3.2.3.2	Herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1).....	34
3.2.3.2.1	<i>Extração de DNA</i> .....	34
3.2.3.2.2	<i>Reação de polimerização em cadeia (PCR)</i> .....	34
3.2.4	<b>Leucograma</b> .....	35
3.2.5	<b>Fenotipagem das subpopulações de linfócitos periféricos T CD4+ e T CD8+ pela técnica de citometria de fluxo</b> .....	35
3.3	<b>Metodologia estatística</b> .....	36
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCV	Calicivírus felino
FeLV	Vírus da leucemia felina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Vírus da imunodeficiência humana
FHV-1	Herpesvírus felino tipo 1
FHV-TK-S	“Primer” senso para reação de PCR para o herpesvírus felino tipo 1
FHV-TK-A	“Primer” anti-senso para reação de PCR para o herpesvírus felino tipo 1
GNU	Gengivite necrótica ulcerativa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
mM	Milimolar
M-MLV	Enzima para reação de transcrição reversa
Nested-PCR	Reação de polimerização em cadeia que amplifica uma sequência interna de um fragmento previamente amplificado
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pmol	Picomoles
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação de polimerização em cadeia precedida de uma reação de transcrição reversa
seg	Segundos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TKN-S	“Primer”senso para reação de nested-PCR para o herpesvírus felino tipo 1
TKN-A	“Primer” anti-senso para reação de nested-PCR para o herpesvírus felino tipo 1
RPE	R-ficoeritrina
U	Unidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias da cavidade oral dos felinos são comuns no cotidiano da prática clínica, e muitas vezes constituem-se em um desafio terapêutico para o veterinário (FROST; WILLIANS, 1986; KNOWLES et al., 1989; GRUFFYDD-JONES, 1991).

As primeiras descrições na literatura classificavam estas manifestações clínicas de *Estomatite Felina Intratável*, atualmente também é conhecida como *Complexo Gengivite-Estomatite-Faringite* ou simplesmente gengivite crônica (GASKELL; GRUFFYDD-JONES, 1977). Histologicamente, a gengivite crônica dos felinos é classificada segundo o padrão de células inflamatórias predominantes em: estomatite linfoplasmocítica, gengivite-estomatite linfocítica plasmocítica, estomatite plasmocítica, estomatite ulcerativa crônica, estomatite necrosante e estomatite gengivite faucite crônica (LYON, 2005).

O complexo gengivite-estomatite felina pode ser comparado com a gengivite ulcerativa necrosante e doença inflamatória periodontal que acontece em humanos (LYON, 2005). A patogênese dessa doença ainda não está bem definida, mas as características histopatológicas da gengivite e da periodontite indicam que há intenso envolvimento imunológico, porém as causas de base geralmente não são identificadas e podem diferir individualmente. Anormalidades no sistema imunológico alteram a resposta imune de cada paciente e predisõem às infecções secundárias, que contribuem para a cronicidade da doença (LOMMER; VERSTRAETE, 2003; LYON, 2005)

Conforme o sistema proposto por Waters et al. (1993), a gengivite dos felinos pode ser classificada em quatro graus, segundo a intensidade e tipos de lesões orais. O grau zero (0) corresponde à ausência de quaisquer sinais de gengivite; um (1) a gengivite branda, onde se observa uma hiperemia discreta nas margens gengivais; dois (2) gengivite moderada, onde o paciente deverá apresentar uma hiperemia gengival bastante evidente, porém sem manifestações de hiperplasia e/ou ulceração gengival; três (3) corresponde a gengivite grave, com hiperemia evidente das margens gengivais, áreas de hiperplasia e/ou ulceração gengival, podendo haver perda de dentes; quatro (4) gengivite muito grave, onde o paciente

deverá apresentar hiperemia gengival bastante evidente, hiperplasia e/ou ulcerações gengivais generalizadas, perda de vários dentes e friabilidade de margens gengivais.

A gengivite se inicia pelo depósito de microorganismos na interface dento-gengival, predispondo então a formação do cálculo dental característico da gengivite (SKALERIC; KOVAK-KAVCIC, 2000).

O cálculo dental, por sua vez, é composto por microbiotas bacterianas diversas e outras substâncias orgânicas, incorporadas a uma matriz inorgânica composta principalmente por hidroxiapatita, cálcio e fósforo (originários da secreção salivar), formando uma placa mineralizada (GRUFFYDD-JONES, 1991).

Esses cálculos localizados nos sulcos gengivais estão em um ambiente extremamente propício a multiplicação, pois nestes sulcos alojam-se restos alimentares, que servem de substrato ao crescimento bacteriano (GRUFFYDD-JONES, 1991). Cria-se, portanto um ambiente de intensa proliferação bacteriana, composto por microorganismos aeróbios e anaeróbios.

As bactérias alojadas no sulco gengival começam a produzir toxinas (hialuronidases e enzimas lisossomais), que aliadas ao grande fluxo de células inflamatórias para o local acometido irritam a gengiva, e começam a desencadear uma reação inflamatória determinando edema gengival, eritema e friabilidade do tecido (GRUFFYDD-JONES, 1991; HARVEY, 1991; DEIHL; ROSYCHUK, 1993). Com a perda da integridade da mucosa, as bactérias por sua vez se alojam nas estruturas do periodonto, causando a periodontite (LYON, 2005). A gengivite e estomatite crônica ocorrem, devido a uma resposta imune à ação bacteriana e a interação com os mecanismos de defesa local. A resposta em cada região em que está localizada a placa bacteriana é regulada individualmente pelo sistema imune local (SIMS et al., 1990).

Os plasmócitos e linfócitos são as células encontradas predominantemente neste tipo de inflamação dos tecidos gengivais. Os plasmócitos produzem anticorpos contra as endotoxinas bacterianas, e esse complexo antígeno/anticorpo ativa o sistema complemento. As substâncias ativadas após a ação do sistema complemento atraem, por quimiotaxia, uma grande quantidade de células fagocíticas, que lesam as membranas das células gengivais, aumentando a permeabilidade vascular local, causando uma intensa retração gengival (HARVEY, 1991).

A síndrome é progressiva e algumas raças de gatos são mais predispostas a desenvolverem gengivite e periodontite, dentre elas, os gatos da raça Maine Coon se destacam com o aparecimento de uma gengivite juvenil que se inicia antes dos dois anos de idade, com a gengiva apresentando-se eritematosa, frágil e com tendência a sangrar facilmente. A inflamação restringe-se a mucosa adjacente aos dentes e ao arco glossopalatino. Com a evolução, o quadro pode se agravar e apresentar-se com lesões proliferativas e ulcerações na orofaringe, arco glossopalatino, gengiva e língua. A inflamação também pode envolver a camada mucosa adjacente (DEIHL; ROSYCHUK, 1993).

Além das alterações acima descritas, outras manifestações muito comuns nestas afecções orais são uma halitose intensa, mobilidade dental, disfagia, e em casos extremos, pode levar a um quadro de dor intensa e anorexia (GRUFFYDD-JONES, 1991; HARVEY, 1994).

De modo geral, os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da gengivite e da estomatite são: dieta do animal, conformação da cavidade oral, características genéticas específicas como, por exemplo, doenças imunomediadas, e doenças sistêmicas como infecções pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV), herpesvírus e/ou calicivírus (FCV) (TENORIO et al., 1991; DEIHL; ROSYCHUK, 1993).

As viroses têm sido implicadas como agentes etiológicos na patogenia da gengivite-estomatite crônica felina. Entretanto, o mecanismo pelo qual as infecções virais participam no desenvolvimento da doença gengival nos animais afetados permanece indeterminado (DEIHL; ROSYCHUK, 1993).

O FCV pertence à família caliciviridae, que também afeta humanos e outros animais. É um vírus pequeno, de capsídeo esférico, não-envelopado, de RNA de fita simples e genoma de aproximadamente 7.7kb (THIEL; KÖNIG, 1999; HURLEY; SYKES, 2003). É o patógeno responsável por grande parte das infecções do trato respiratório superior de gatos domésticos (KNOWLES et al., 1991; THIEL; KÖNIG, 1999; RADFORD et al., 2000; LOMER; VERSTRAETE, 2003; HURLEY; SYKES, 2003).

Atualmente têm-se descrito o envolvimento do FCV nas estomatites crônicas, bem como nas glossites ulcerativas e ulceroproliferativas crônicas refratárias ao tratamento (DEIHL; ROSYCHUCK, 1993; HURLEY; SYKES, 2003). A incidência da infecção pelo FCV nos gatos com gengivite-estomatite-faringite



crônica, relatada em vários estudos, varia de 20 a 90%, no entanto, não se sabe ao certo qual o envolvimento do FCV como agente etiológico primário (DIEHL; ROSYCHUCK, 1993; ADDIE et al., 2003; LOMER; VERSTRAETE, 2003).

As vias de infecção pelo FCV são predominantemente a respiratória, oral e conjuntival, sendo que a replicação viral ocorre inicialmente nos tecidos epiteliais do trato respiratório e cavidade oral, induzindo necrose epitelial e ulcerações. As cepas de FCV diferem em relação ao tropismo e a virulência, portanto uma grande variedade de manifestações clínicas pode ser observada. Na grande maioria dos casos, a maior parte das cepas causa febre, ulceração da mucosa oral, alterações discretas do trato respiratório cranial, como espirros e secreção nasal, e conjuntivite. Algumas cepas podem induzir claudicação, frequentemente observada após vacinação (GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; RADFORD et al., 2007; RADFORD et al., 2009).

Os gatos que se recuperam de doença respiratória do trato anterior podem desenvolver infecção persistente na orofaringe, chamado de estado de portador de FCV. O vírus é eliminado continuamente deste local, embora a magnitude da eliminação varie com o tempo e entre indivíduos. Esses gatos podem servir como fonte de infecção para outros gatos susceptíveis. Em muitos gatos, a eliminação do vírus termina semanas a meses após a infecção, mas em um pequeno número de gatos, a eliminação dura à vida toda (HURLEY; SYKES, 2003).

O FCV causa infecções persistentes. Por causa do estado de portador crônico, a prevalência da infecção por FCV em gatos saudáveis é grande, alcançando de 8 a 24% dos gatos domésticos (THIEL; KÖNIG, 1999; HURLEY; SYKES, 2003). Como aproximadamente 85% dos gatos com estomatite crônica aparentam ser portadores crônicos, este fato pode ser um pré-requisito para a indução da estomatite crônica nesses indivíduos (KNOWLES et al., 1991).

No início da década de 1990, alguns autores iniciaram a descrição da associação da presença do FCV com o desenvolvimento da gengivite-estomatite (KNOWLES et al., 1989; HARBOUR; HOWARD; GASKELL, 1991; WATERS et al., 1993; ADDIE et al., 2003), porém outros estudos experimentais falharam ao tentar induzir a gengivite crônica pelo FCV (KNOWLES et al., 1991; TENORIO et al., 1991; POULET et al., 2000).

Posteriormente, outros trabalhos foram publicados mostrando intensa correlação entre a ocorrência do FCV e a presença de gengivite-estomatite quando

comparados aos gatos do grupo controle (LOMMER; VERSTRAETE, 2003; DOWERS et al., 2009)

Poulet et al. (2000) demonstraram que o FCV que está associado aos quadros de gengivite-estomatite crônicas é diferente antigenicamente dos que causam doença do trato respiratório, sendo isto provavelmente resultado da cronicidade da infecção. Acredita-se que não há biótipos específicos para distintas manifestações de doenças, mas sim variação antigênica, com a presença de regiões hipervariáveis do capsídeo protéico típica da família caliciviridae.

A variação antigênica é provavelmente responsável pelas diferenças entre FCV isolados de diferentes origens geográficas (LOMER; VERSTRAETE, 2003).

Nos últimos 10 anos foram relatados surtos de uma doença sistêmica nos EUA e Europa, causada por uma cepa extremamente virulenta de FCV (VS-FCV). Os animais acometidos apresentavam febre, alterações respiratórias, edema de face e membros, icterícia, pancreatite e manifestações hemorrágicas. A mortalidade nestes surtos chegou a 50% e a maioria dos gatos morreram em poucos dias (PEDERSEN et al., 2000; HURLEY; SYKES, 2003; SCHORR-EVANS et al., 2003; HURLEY et al., 2004; REYNOLDS et al., 2009).

Em estudo realizado por Lomer e Verstraete (2003), foi demonstrado que 88% dos gatos estudados que apresentavam gengivite-estomatite crônica, apresentavam infecção pelo FCV e herpesvírus do tipo 1 concomitantemente. Os autores acreditam que a infecção pelo FCV e herpesvírus tipo 1 combinadas com placa bacteriana estimulam o aumento de infiltrado linfocítico na mucosa oral. De qualquer modo, a relação causal não pôde ser demonstrada.

O herpesvírus tipo 1 (FHV-1) é um alfavírus e está mais comumente associado com a rinotraqueíte em gatos, porém está ligado a outras síndromes como agente causal incluindo conjuntivite e ceratite crônicas, faringite, glossite e palatite ulcerativas, dermatite facial, abortos e mortalidade neonatal. Durante os estágios iniciais da infecção o vírus pode ser facilmente isolado da conjuntiva, orofaringe e de *swabs* nasais, porém seu isolamento torna-se mais difícil quando há resolução dos sintomas (LOMER; VERSTRAETE, 2003; GASKELL et al., 2007). Gatos podem apresentar infecções latentes com persistência do vírus em diversos tecidos, que pode voltar a ser eliminado em situações de estresse, gestação, lactação e durante tratamento com corticóides. Estima-se que 80% dos gatos com

infecção pelo vírus da imunodeficiência felina tenham infecções latentes pelo herpesvírus (WEIGLER et al., 1997).

Atualmente vários estudos têm sido realizados testando-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) para detecção FHV-1, onde se obteve uma alta sensibilidade e especificidade do mesmo (WEIGLER et al., 1997; SYKES et al., 2001; LOMER; VERSTRAETE, 2003; MARSILIO et al., 2005).

Enquanto não se conhece o real envolvimento do FHV-1 no desenvolvimento das doenças orais inflamatórias dos felinos, a gengivite-estomatite causada pelo herpesvírus é bem reconhecida em seres humanos, caracterizada por vesículas e úlceras na mucosa oral, lábios e face. Recentemente as herpesviroses têm sido implicadas como causa de base nas periodontites em humanos (LOMER; VERSTRAETE, 2003).

Dentre os retrovírus capazes de infectar e induzir doenças em gatos, o vírus da imunodeficiência (FIV), pertencente à subfamília dos Lentivírus, tem recebido especial atenção nos últimos anos, pois além de estar amplamente disseminado na população felina mundial, pode também determinar nos animais infectados uma síndrome semelhante à imunodeficiência adquirida, observada em pacientes humanos infectados pelo também lentivírus HIV. Este fato torna o felino infectado pelo FIV um modelo de estudo bastante eficaz, principalmente no que diz respeito à avaliação de fármacos antivirais, na patogenia e curso da doença, bem como nos testes vacinais (BEEBE et al., 1994; BENDINELLI et al., 1995; RECHE JR et al., 1997).

A infecção persistente é uma das principais características dos Retrovírus e pode ocorrer, primeiramente, por meio da integração da cópia do genoma viral (provírus) ao DNA da célula do hospedeiro e aí permanecer até a morte da célula. O segundo mecanismo, que facilita a permanência do agente viral no organismo do hospedeiro, seria a evasão bastante eficiente do vírus às respostas imunes específicas montadas pelo paciente (JARRETT, 1999).

A cinética da infecção pelo FIV e pelo HIV é muito semelhante (DIEHLA et al., 1995). Quando os gatos se infectam, naturalmente ou são inoculados experimentalmente, partículas virais são encontradas no plasma num período que varia de três a quatro semanas após a infecção. Em gatos experimentalmente infectados, as manifestações clínicas como letargia, febre intermitente e linfadenomegalia transitória, normalmente acompanham esse período de infecção

aguda. No entanto, nos casos de infecção natural, essa fase é pouco perceptível. O animal entra então na fase de infecção latente ou assintomática, a qual pode se estender por muitos anos sem que o felino apresente quaisquer anormalidades clínicas (BENDINELLI et al., 1995).

A inflamação gengival crônica é uma das consequências mais comuns da infecção pelo FIV. Estudos realizados por diversos autores demonstram que cerca de 50 a 80% dos gatos infectados pelo FIV apresentam gengivite crônica, associada ou não a outras manifestações clínicas da doença (KNOWLES et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989; ZENGER, 1990; GRUFFYDD-JONES, 1991; WATERS et al., 1993; HARVEY, 1994; WILLIS, 2000).

Em pacientes humanos infectados pelo HIV, as lesões em cavidade oral, induzidas direta ou indiretamente pelo vírus, também são comuns e têm sido consideradas como fatores indicadores da progressão da doença. De fato, observa-se que a contagem de linfócitos T CD4+ é inversamente proporcional ao número e gravidade das lesões orais (PATTON, 2000; RAMOS-GOMEZ et al., 2000).

Corroboram com tais informações a evidência de que o uso de fármacos anti-HIV proporcionam melhora clínica significativa das lesões orais, em pacientes infectados pelo HIV e com gengivite crônica. Concluindo-se que tal melhora deva estar relacionada a um aumento no número de linfócitos T CD4+, devido ao uso do antiviral (CEBALLOS-SALOBRENA et al., 2000).

Sabe-se que a resposta imunológica celular exerce um papel fundamental no estabelecimento da inflamação gengival. Na gengivite, às bactérias presentes no sulco gengival ativam a imunidade local provocando intensa migração de células, como plasmócitos e linfócitos, desencadeando a reação inflamatória. (GRUFFYDD-JONES, 1991; HARVEY, 1991; DEIHL; ROSYCHUK, 1993). Portanto, para que ocorra a migração de células inflamatórias para a gengiva, essas células precisam ser recrutadas da periferia, desta forma espera-se um aumento dessas células na circulação, mesmo que momentaneamente. De fato, Odden et al. (1995) descrevem a alta prevalência de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ no tecido gengival de pacientes humanos com gengivite crônica.

A depleção da imunidade celular, portanto, poderia predispor ao desenvolvimento de inflamação gengival grave e crônica. Em estudo realizado por Ercivas et al. (2006), em pacientes humanos com gengivite e periodontite crônicas, concluiu-se que a imunidade celular local, mediada por linfócitos T CD4+ e CD8+

exerce um papel significativo na fisiopatologia da inflamação do periodonto e gengiva.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista a susceptibilidade dos gatos da raça Maine Coon ao desenvolvimento da gengivite crônica, bem como os fatores associados que podem predispor a doença, os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar quantitativamente a resposta imunológica celular, mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, em gatos da raça Maine Coon com e sem gengivite crônica, e pesquisar a ocorrência de herpesvírus tipo 1 e/ou Calicivírus na gengiva desses gatos.
- Correlacionar à influência do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no aparecimento e curso da gengivite em gatos da raça Maine Coon, tendo como comparação animais de outras raças também com gengivite, bem como Maine Coons sem afecção oral.
- Verificar a correlação da presença do herpesvírus tipo 1 e/ou calicivírus com a gengivite crônica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 84 felinos oriundos de três diferentes criatórios, divididos nos seguintes grupos:

**GRUPO I:** composto por 20 gatos da raça Maine Coon, com gengivite-estomatite crônica, graus 2-4 (WATERS et al., 1993) (Apêndices A, B, C e D).

**GRUPO II:** composto por 23 gatos da raça Maine Coon sem manifestações de gengivite.

**GRUPO III:** composto por 21 gatos de raças diversas (British Shorthair, Sagrado da Birmânia, Bengal, Norwegian Forest Cat e Ragdoll) com gengivite-estomatite crônica, graus 2-4 (WATERS et al., 1993).

**GRUPO IV:** composto por 20 gatos de raças diversas (British Shorthair, Sagrado da Birmânia, Bengal, Norwegian Forest Cat e Ragdoll) sem manifestações de gengivite.

#### 3.2 EXAMES LABORATORIAIS

##### 3.2.1 Reação de polimerização em cadeia (PCR) para o vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV).

O material genético foi extraído das amostras de sangue, utilizando-se um kit comercial de extração<sup>1</sup>, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para a identificação do DNA viral do FIV, utilizou-se a técnica de PCR-Nested, descrita por Hohdatsu et al. (1998). Para a PCR foram utilizados os

---

<sup>1</sup> GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification Kit®, Amersham Biosciences

oligonucleotídeos iniciadores (“primer”) FIV - A (“antisense”) 5’ TTTTCTTCTAGGGTACTTTCTGG 3’ e FIV - S (“sense”) 5’ AATATGGCTGTATCTACTGC 3’. E na PCR - Nested, os “primers” FIV NESTED - A (“antisense”) 5’ CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT 3’ e FIV - S (“sense”) 5’TATTCAAACAGTAAATGGAG 3’.

Como controle positivo para as reações da PCR para detecção do FIV, foram utilizadas amostras de sangue de gatos sabidamente infectados pelo FIV. Como controle negativo em cada reação, foi utilizada água ultra-pura desde a fase de extração de ácidos nucléicos até a amplificação.

### **3.2.2 Imunofluorescência para detecção do vírus da leucemia felina (FeLV).**

Os esfregaços sanguíneos obtidos de todos os gatos arrolados no experimento foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta para detecção do FeLV, descrita por Junqueira-Jorge (2005). Esses exames foram realizados no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. Os gatos infectados pelo vírus da Leucemia Felina foram excluídos do experimento.

### **3.2.3 Reação de polimerização em cadeia para o calicivírus felino (FCV) e herpesvírus felino tipo 1 (FHV – 1).**

A pesquisa de ambos os agentes foi realizada por meio da PCR, a partir de *swabs* obtidos da cavidade oral, sendo que uma amostra de cada animal foi testada para calicivírus e herpesvírus tipo-1.



### 3.2.3.1 Calicivírus felino (FCV)

#### 3.2.3.1.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído diretamente dos *swabs* utilizando TRIzol (Invitrogen™) segundo as instruções do fabricante.

#### 3.2.3.1.2 Transcrição reversa (*síntese de cDNA, DNA complementar*)

Foi utilizado um par de *primers* direcionado à fração codificadora da proteína hipotética 2C-helicase, localizada na extremidade 5' do RNA viral do FCV. Os *primers*, designados FVC24 (5' CTCAAACCTCTGAGCTTCG 3') e FCV414 (5' GTGAGCTGTTCTTTGCAC 3'), determinam um produto amplificado de 391 nucleotídeos.

Para a síntese de cDNA, desnaturou-se 3,5µL do RNA extraído a 95 °C durante 5 minutos e adicionou-se ao *mix* para a transcrição reversa contendo 1 x *First Strand Buffer* (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/µL de cada *primer* e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™) para um volume final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60 minutos.

#### 3.2.3.1.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação da PCR pela adição de 5 µL de cada c-DNA ao *mix* da PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer*, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 50µL) e submetidos a 40 ciclos com as temperaturas 95°C por 30

seg, 56°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, seguidos por 72°C por 10 minutos para a extensão final.

O produto da reação da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL.

### 3.2.3.2 Herpesvírus felino tipo-1 (FHV-1)

#### 3.2.3.2.1 Extração de DNA

O DNA total foi extraído diretamente dos *swabs* segundo o protocolo descrito por Chomkczynski (1993).

#### 3.2.3.2.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Foram sintetizados os seguintes *primers* utilizando-se como base sequências obtidas no GenBank: FHV-TK-S 5' GAGCCGCCCAATAAACACTC 3' e FHV-TK-A 5' TCATTCTGAACGGGGATGGT 3' para amplificação de um segmento de 201pb do gene da timidina-quinase do FHV-1.

Para tanto, 5 µL de cada DNA extraído foram adicionados ao respectivo mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM de cada primer, 0,5U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) e água ultra-pura q.s.p. 50 µL, levando-se ao termociclador para desnaturação a 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg e 72°C por 45 seg, seguidos de uma extensão final a 72° por 5 minutos.

Em seguida, procedeu-se a reação de nested PCR, utilizando-se 5 µL de cada produto da primeira amplificação, as mesmas concentrações dos reagentes descritos anteriormente e o mesmo ciclo de amplificação. Para a nested-PCR foi utilizado o seguinte par de *primers*: TKN-S 5' GGATATATCGCGCTTGAGGA 3' e

TKN-A 5' ATTCTGAACGGGGATGGTTC 3', para amplificação de um segmento de 143pb.

O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com solução de brometo de etídeo a 0,5µg/mL.

### **3.2.4 Leucograma**

De todos os 84 felinos incluídos no estudo, foram colhidas amostras de sangue total (5ml), por meio da venipunctura jugular ou cefálica e armazenadas em tubos estéreis contendo anticoagulante (EDTA). As contagens globais de leucócitos foram realizadas utilizando-se sistema automatizado (Serono® – System 9020AX). O exame diferencial dos leucócitos foi realizado a partir de esfregaços de sangue preparados a fresco e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

### **3.2.5 Fenotipagem das subpopulações de linfócitos periféricos CD4+ e CD8+ pela técnica de citometria de fluxo:**

As subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) foram quantificadas em sangue periférico, de todos os 84 felinos utilizados no experimento, pela técnica de citometria de fluxo (BYRNE et al., 2000), a saber:

- O sangue total colhido (5ml/gato) armazenado em frascos contendo EDTA como anticoagulante, foi mantido à temperatura ambiente e processado no prazo de 4 horas após a colheita.
- Antes de iniciar a técnica de citometria, procedeu-se a contagem dos leucócitos totais, segundo a metodologia descrita no item 3.2.4. Se o número total de leucócitos estivesse entre 5.000 e 10.000 células/mm<sup>3</sup> realizou-se o ajuste apropriado, como a diminuição na quantidade do anticorpo monoclonal específico ou a diluição da amostra.

- Para a técnica de citometria, pipetou-se 100µL do sangue total em tubos<sup>2</sup> de 5ml.
- Adicionou-se 10µL de anticorpo monoclonal específico CD4+ (FITC)<sup>3</sup> e CD8+ (RPE)<sup>3</sup> em cada tubo, e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente.
- Foram acrescentadas nessas amostras 900µL de solução lise<sup>4</sup> diluída em cada tubo e homogeneizadas com *Vortex*. Essa solução foi utilizada para a lise os eritrócitos e preservação dos leucócitos.
- A seguir será realizada a leitura no citômetro de fluxo<sup>5</sup>. Os resultados foram apresentados em números absolutos e relativos de linfócitos T CD4+ e CD8+ por µL, a partir da contagem total de linfócitos do leucograma. Foram utilizados como controles IgG de camundongos, subclasses IgG1<sup>3</sup>, conjugados aos fluorocromos FITC e RPE.

### 3.3 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A análise dos dados constou inicialmente da avaliação da associação entre a virose FCV e grupo de estudo, e a influência dessas duas variáveis na ocorrência de gengivite. Para tanto, foram construídas tabelas de frequências absolutas e porcentagens e utilizou-se o **Teste Qui-quadrado de Pearson** (FLEISS, 1981). Para avaliar a influência conjunta do FCV e grupo na ocorrência de gengivite utilizou-se a metodologia de **Regressão Logística** (HOSMER; LEMESHOW, 1976).

Para cada combinação dos fatores grupo, FCV e gengivite as variáveis CD4+, CD8+, relação CD4+/CD8+ e linfócitos totais foram resumidas por meio das medidas: mínimo e máximo, mediana, 1º quartil (Q1), 3º quartil (Q3), média e erro-padrão, gráficos de média com intervalos de 95% de confiança e box-plots. As violações das suposições do modelo de **Análise de Variância** foram corrigidas pela transformação logarítmica (base 10) (NETER et al., 1996). Comparando médias por meio da Análise de Variância foi possível estudar a influência conjunta dos fatores grupo, FCV e gengivite em cada uma dessas variáveis.

<sup>2</sup> Tubos de poliestireno – Becton-Dickinson

<sup>3</sup> Serotec – [www.serotec.co.uk](http://www.serotec.co.uk)

<sup>4</sup> Solução de lise, “Facslysing Solution”- Becton-Dickinson

<sup>5</sup> Becton-Dickinson FACScan

O nível de significância estabelecido para as análises foi de 5%.

## **4 RESULTADOS**

### **Reação em cadeia pela polimerase para o vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV).**

Seguindo a técnica descrita na metodologia, nenhuma das amostras de sangue dos felinos utilizados no presente estudo foi positiva para a pesquisa do lentivírus felino.

### **Imunofluorescência para detecção do vírus da Leucemia Felina (FeLV).**

Seguindo a técnica descrita na metodologia, nenhum dos felinos era infectado pelo vírus da leucemia felina.

### **Reação em cadeia pela polimerase para o Herpesvírus tipo 1 e Calicivírus**

A PCR para a detecção do FHV-1 foi positiva em apenas um gato do grupo III. Sendo assim, este animal será descrito como um achado, e a correlação dos grupos foi feita somente com o FCV.

Foram realizados 84 exames de PCR para a detecção do FCV em animais com gengivite crônica. Pôde-se observar, através da análise univariada, que a presença do vírus em cavidade oral está relacionada com a gengivite ( $p < 0,001$ ). Entre os animais positivos para o FCV, 88,9% apresentaram gengivite enquanto que entre os animais negativos para o FCV, 29,8% apresentaram gengivite (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição de frequências da gengivite segundo a identificação do FCV na cavidade oral – São Paulo – 2010

Fator	Categoria	Gengivite				Total	p	
		Negativo		Positivo				
		N	%	N	%			(nível descritivo)
FCV	Negativo	40	70,2	17	29,8	57	100,0	<0,001 <sup>(1)</sup>
	Positivo	3	11,1	24	88,9	27	100,0	

1: Qui-quadrado

Pelo modelo de regressão logística, testou-se o fato da interação entre os grupos de estudo e a presença do FCV; os resultados indicam que não existe interação entre os grupos e a presença do FCV ( $p > 0,05$ ). Ou seja, a relação entre a presença do FCV é a mesma entre ambos os grupos de gatos com gengivite, não existindo maior prevalência em animais da raça Maine Coon (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das frequências do FCV segundo os grupos com gengivite crônica – São Paulo – 2010

	Negativo	Positivo	Total	p (nível descritivo)
Grupo I	5	15	20	0,0765
Grupo III	12	9	21	
Total	17	24	41	

Determinou-se também que a chance de desenvolvimento da gengivite (“odds ratio”) para animais que possuem FCV na cavidade oral é 18,823 vezes maior que os animais não portadores do FCV na cavidade oral (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Estimativas das razões de chances de desenvolver Gengivite – São Paulo – 2010

Virose	Razão de Chances “odds ratio”	I.C. 95% para a Razão de Chances
FCV	18,823	[4,990 ; 71,002]

Tabela 4 – Probabilidades estimadas de desenvolver Gengivite – São Paulo – 2010

FCV	Estimativa da probabilidade	I.C. 95% para probabilidade
Negativo	0,298	[ 0,194 ; 0,428 ]
Positivo	0,889	[ 0,707 ; 0,964 ]



## **Fenotipagem das subpopulações de linfócitos periféricos CD4+ e CD8+ pela técnica de citometria de fluxo**

As subpopulações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) foram quantificadas do sangue periférico, dos 84 felinos, pela técnica de citometria de fluxo (BYRNE et al., 2000).

As medidas descritivas dos valores absolutos de linfócitos T CD4+ nos diferentes grupos encontram-se nas tabelas 5 e 6, e ilustradas nos gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 5 – Medidas descritivas da concentração de linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Grupo</b>	<b>FCV</b>	<b>Gengivite</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
Maine Coon	Negativo	Negativo	21	279,45	872,96	1.341,99	2.525,84	4.747,60	1.796,82	256,31
		Positivo	5	380,95	482,74	548,02	1.276,19	3.298,15	1.197,21	548,56
	Positivo	Negativo	2	1.503,74	1.503,74	2.907,48	4.311,22	4.311,22	2.907,48	1.403,74
		Positivo	15	253,24	514,08	685,01	1.207,22	3.264,06	959,07	194,12
Outras raças	Negativo	Negativo	19	298,53	819,68	1.291,26	1.929,31	5.510,75	1.621,67	285,66
		Positivo	12	146,66	864,46	1522,37	2829,56	4745,48	1856,81	392,78
	Positivo	Negativo	1	921,20	921,20	921,20	921,20	921,20	921,20	—
		Positivo	9	534,01	724,08	1.158,30	1.450,68	2.122,73	1.179,74	169,86

Tabela 6 – Medidas descritivas da concentração de linfócitos T CD4+ segundo grupo, FCV e gengivite, separadamente – São Paulo – 2010

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
GRUPO	Maine Coon	43	253,24	623,28	1173,48	2419,01	4747,60	1486,52	176,27
	Outras raças	41	146,66	819,68	1354,70	1746,14	5510,75	1576,40	180,07
FCV	Negativo	57	146,66	819,68	1341,99	2434,02	5510,75	1698,47	161,98
	Positivo	27	253,24	610,74	921,20	1497,60	4311,22	1175,55	171,71
Gengivite	Negativo	43	279,45	872,96	1341,99	2434,02	5510,75	1750,72	187,02
	Positivo	41	146,66	548,02	1158,30	1538,41	4745,48	1299,30	160,07

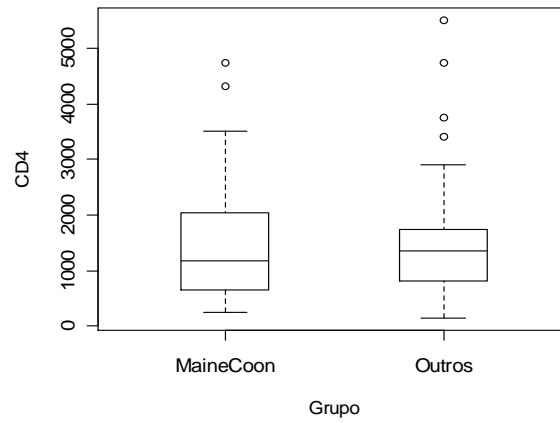


Gráfico 1 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo grupo – São Paulo – 2010

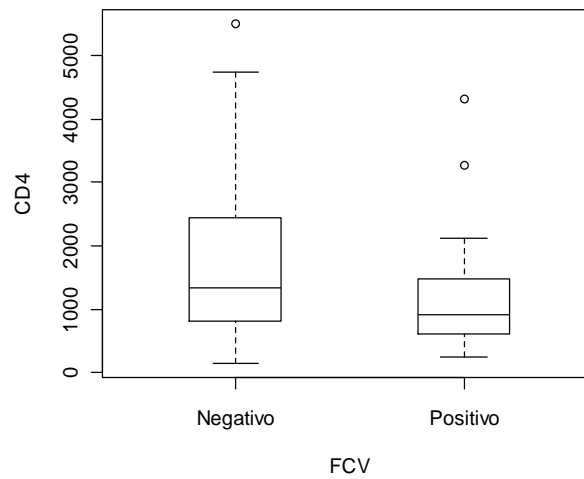


Gráfico 2 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+segundo FCV – São Paulo – 2010

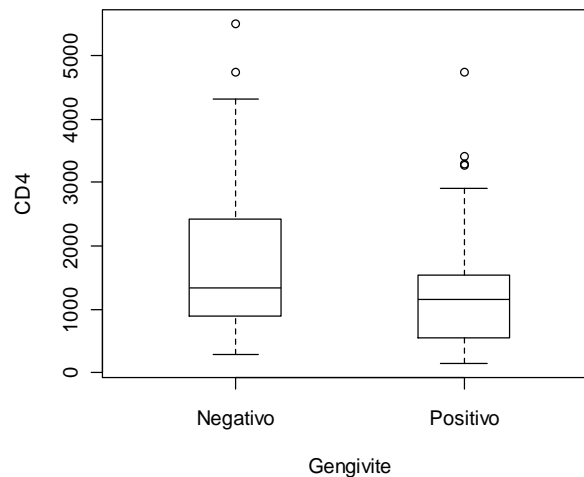


Gráfico 3 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo gengivite – São Paulo – 2010

A variável da contagem de linfócitos T CD4+ apresentou um desvio da normalidade que pôde ser corrigido com a transformação logarítmica (base10). Após a transformação aplicou-se a metodologia de Análise de Variância para comparar as médias  $\log_{10}(\text{CD4+})$  das combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite, conforme se encontra descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o  $\log_{10}(\text{TCD4+})$  com os fatores grupo, FCV e gengivite – estudo das interações – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
Interação grupo × FCV × gengivite	0,453
Interação grupo × FCV	0,340
<b>Interação grupo × gengivite</b>	<b>0,072</b>
Interação FCV × gengivite	0,630

Observa-se que para a variável linfócitos T CD4+ existe uma tendência de interação entre grupo e gengivite. Em virtude disso, ajustou-se novamente um modelo com o efeito principal sendo o FCV e somente com a interação entre grupo de estudo e gengivite, para proceder com as comparações múltiplas dos animais

com e sem gengivite para cada grupo, e, dos grupos para presença ou ausência de gengivite, conforme evidenciado na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos a partir da análise de variância para o  $\log_{10}(\text{TCD4+})$  com o fator FCV e a interação entre grupo e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
FCV	0,799
<b>Gengivite+ × Gengivite- para Maine Coons</b>	<b>0,020</b>
Gengivite+ × Gengivite- para Outros	0,907
Maine Coon × Outros para gengivite -	0,410
Maine Coon × Outros para gengivite +	0,087

De acordo com a análise de variância, o efeito da presença do FCV nos níveis de linfócitos TCD4+ não é significativo.

Para os animais da raça Maine Coon, os níveis de linfócitos TCD4+ são, em média, menores em gatos com gengivite crônica do que em gatos sem a enfermidade oral ( $p=0,020$ ). Já para animais de outras raças, essa diferença não é significativa ( $p=0,970$ ).

Ao comparar os grupos de gatos da raça Maine Coon e de gatos de outras raças, observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis médios de linfócitos TCD4+ tanto para os animais com gengivite ( $p=0,087$ ) como para os gatos sem gengivite ( $p=0,410$ ).

As medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD8+ nos diferentes grupos encontram-se nas tabelas 9 e 10, e ilustradas nos gráficos 4, 5 e 6.

Tabela 9 – Medidas Descritivas da concentração de linfócitos T CD8+ segundo as combinações dos fatores Grupo, FCV e Gengivite – São Paulo – 2010

<b>Grupo</b>	<b>FCV</b>	<b>Gengivite</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
Maine Coon	Negativo	Negativo	21	302,40	461,61	754,47	924,00	2.005,08	806,27	95,94
		Positivo	5	226,51	291,65	581,02	1.162,56	5.254,13	1.503,17	952,20
	Positivo	Negativo	2	951,81	951,81	1.439,05	1.926,29	1.926,29	1.439,05	487,24
		Positivo	15	223,61	462,00	1.039,58	1.505,45	2.956,82	1.135,27	205,38
Outras raças	Negativo	Negativo	19	239,04	332,51	556,18	1.153,15	3.321,86	827,66	172,37
		Positivo	12	115,24	443,32	710,23	790,96	3198,04	882,91	241,98
	Positivo	Negativo	1	526,40	526,40	526,40	526,40	526,40	526,40	—
		Positivo	9	263,77	561,60	582,12	1.079,57	2.498,41	904,86	227,16

Tabela 10 – Medidas descritivas da concentração de linfócitos T CD8+ segundo grupo, FCV e gengivite, separadamente – São Paulo – 2010

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
GRUPO	Maine Coon	43	223,61	462,00	800,01	1254,40	5254,13	1031,51	137,22
	Outras raças	41	115,24	384,80	582,12	1053,36	3321,86	853,43	115,19
FCV	Negativo	57	115,24	384,80	644,44	924,00	5254,13	890,66	114,70
	Positivo	27	223,61	526,40	951,81	1461,83	2956,82	1058,42	140,83
Gengivite	Negativo	43	239,04	423,02	644,44	1005,84	3321,86	838,64	92,18
	Positivo	41	115,24	462,00	689,59	1243,01	5254,13	1055,70	156,36



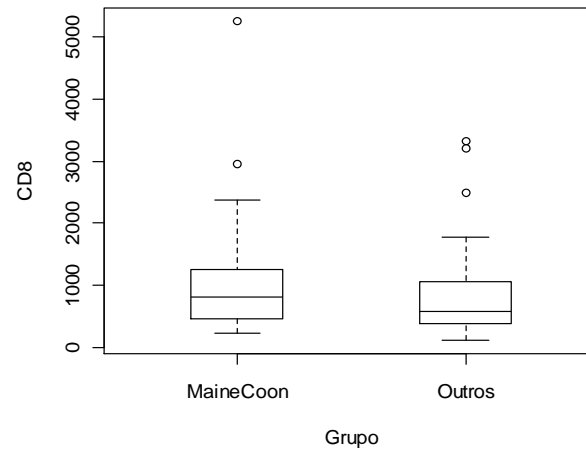


Gráfico 4 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo grupo – São Paulo – 2010

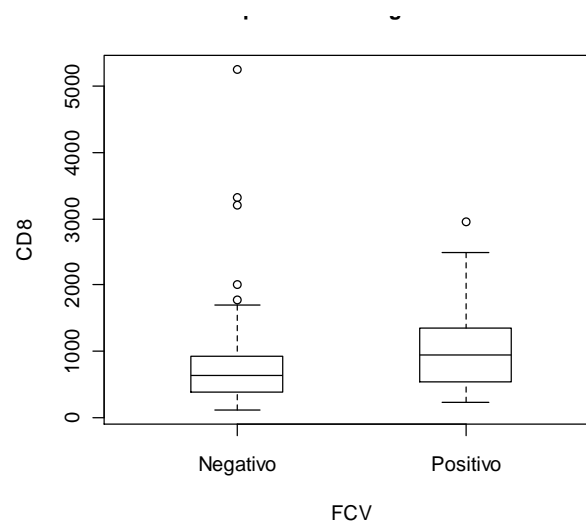


Gráfico 5 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo FCV – São Paulo – 2010

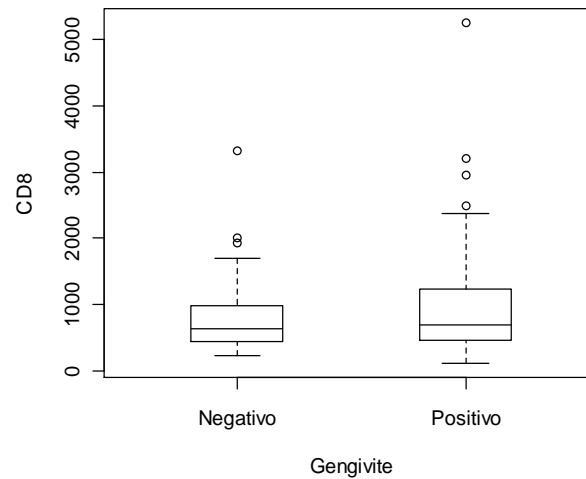


Gráfico 6 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos T CD8+ segundo gengivite – São Paulo – 2010

A variável linfócitos T CD8+, assim como os linfócitos T CD4+, apresentou um desvio da normalidade que pôde ser corrigido com a transformação logarítmica (base10). Os resultados da Análise de Variância encontram-se descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o  $\log_{10}(TCD8+)$  com os fatores grupo, FCV e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
Interação grupo × FCV × gengivite	0,454
Interação grupo × FCV	0,420
Interação grupo × gengivite	0,507
Interação FCV × gengivite	0,871
<hr/>	
Efeito principal de grupo	0,187
Efeito principal de FCV	0,467
Efeito principal de gengivite	0,978

Conforme as análises de variância, os níveis de linfócitos TCD8+ não se alteram significativamente para nenhuma combinação dos fatores ou para cada fator isoladamente.

As medidas descritivas dos valores da relação CD4+:CD8+, nos diferentes grupos encontram-se nas tabelas 12 e 13, e ilustradas nos gráficos 7, 8 e 9.

Tabela 12 – Medidas descritivas da relação CD4+:CD8+ segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Grupo</b>	<b>FCV</b>	<b>Gengivite</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
Maine Coon	Negativo	Negativo	21	0,60	1,30	2,32	3,02	4,56	2,33	0,23
		Positivo	5	0,41	0,62	1,68	1,87	2,19	1,35	0,35
	Positivo	Negativo	2	1,57	1,57	1,90	2,23	2,23	1,90	0,33
		Positivo	15	0,17	0,40	0,92	1,91	5,65	1,32	0,36
Outros	Negativo	Negativo	19	0,77	1,67	2,06	3,08	3,73	2,20	0,18
		Positivo	12	1,19	1,52	2,05	2,64	3,87	2,21	0,25
	Positivo	Negativo	1	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	—
		Positivo	9	0,28	1,43	1,80	2,49	2,75	1,75	0,27

Tabela 13 – Medidas descritivas da relação CD4+:CD8+ segundo cada fator separadamente – São Paulo – 2010

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
GRUPO	Maine Coon	43	0,17	0,92	1,73	2,51	5,65	1,84	0,19
	Outros	41	0,28	1,55	2,04	2,49	3,87	2,09	0,13
FCV	Negativo	57	0,41	1,55	2,18	2,79	4,56	2,17	0,12
	Positivo	27	0,17	0,49	1,43	2,23	5,65	1,52	0,22
Gengivite	Negativo	43	0,60	1,57	2,21	3,02	4,56	2,24	0,14
	Positivo	41	0,17	0,89	1,56	2,31	5,65	1,68	0,17

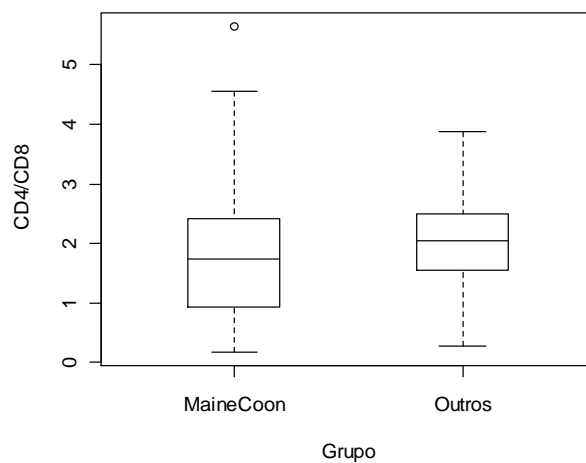


Gráfico 7 – Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo grupo – São Paulo – 2010

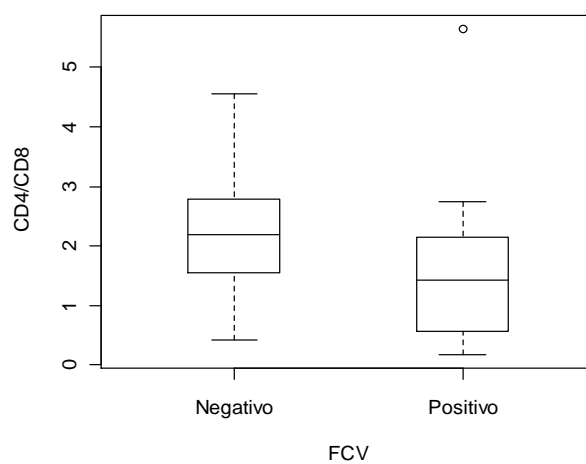


Gráfico 8 – Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo FCV – São Paulo – 2010

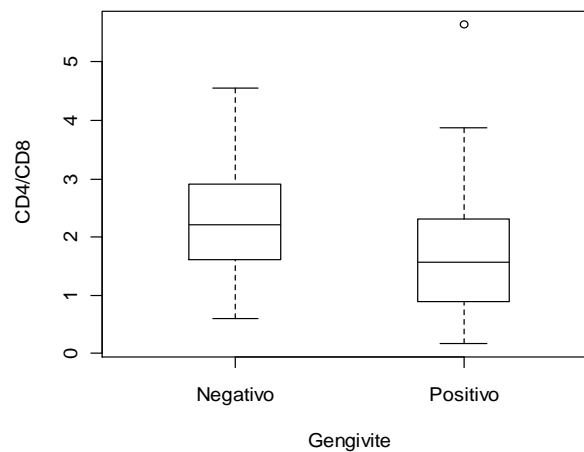


Gráfico 9 – Diagrama de caixas da relação CD4+:CD8+ segundo gengivite – São Paulo – 2010

Conforme descrito anteriormente, para garantir as suposições da Análise de Variância, aplicou-se novamente a transformação logarítmica na variável CD4+:CD8+, conforme descrito na tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos a partir da análise de variância para o  $\log_{10}(\text{CD4}+:\text{CD8}+)$  com os fatores grupo, FCV e gengivite – estudo das interações – São Paulo – 2010

Efeito	p (nível descritivo)
Interação GRUPO × FCV × Gengivite	0,976
Interação GRUPO × FCV	0,877
<b>Interação GRUPO × Gengivite</b>	<b>0,168</b>
Interação FCV × Gengivite	0,716

Observa-se que para a relação CD4+:CD8+ existe uma tendência de interação entre o grupo de estudo e a presença de gengivite. Em virtude disso, ajustou-se novamente um modelo com o intuito de verificar essa interação e proceder com comparações múltiplas de tal forma a estudar as diferenças da relação

CD4+:CD8+ entre os animais com e sem gengivite para cada grupo, e, entre os grupos para a presença ou ausência de gengivite, conforme evidenciado na tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o  $\log_{10}(\text{CD4+}:\text{CD8+})$  com o fator FCV e a interação entre grupo e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
FCV	0,152
<b>Gengivite+ × Gengivite- para Maine Coon</b>	<b>0,005</b>
Gengivite+ × Gengivite- para Outros	0,886
Maine Coon × Outros para Gengivite-	0,913
<b>Maine Coon × Outros para Gengivite+</b>	<b>0,004</b>

Conforme análise de variância, a presença do FCV na cavidade oral não tem influência significativa na relação CD4+:CD8+.

Para os animais da raça Maine Coon, a relação CD4+:CD8+ é, em média, menor nos animais com gengivite do que nos animais sem doença oral ( $p=0,005$ ). Já para o grupo de animais de outras raças, essa diferença não é significativa ( $p=0,886$ ).

Por outro lado, ao comparar os grupos de animais da raça Maine Coon e gatos de outras raças, observa-se diferença significativa somente para os que têm gengivite, sendo que na presença da doença, os animais da raça Maine Coon possuem a relação CD4+:CD8+ significativamente menor do que os animais de outras raças ( $p=0,004$ ). Já para os grupos de animais que não têm gengivite não há diferença entre raças ( $p=0,913$ ).

As medidas descritivas dos valores de linfócitos totais nos diferentes grupos encontram-se nas tabelas 16 e 17, e ilustradas nos gráficos 10, 11 e 12.



Tabela 16 – Medidas descritivas da concentração de linfócitos totais segundo as combinações dos fatores grupo, FCV e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Grupo</b>	<b>FCV</b>	<b>Gengivite</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
Maine Coon	Negativo	Negativo	21	2.070,00	3.978,00	5.780,00	8.382,00	14.300,00	6.879,62	797,61
		Positivo	5	1.716,00	2.352,00	5.536,00	6.413,00	8.184,00	4.840,20	1.226,59
	Positivo	Negativo	2	5.632,00	5.632,00	9.368,00	13.104,00	13.104,00	9.368,00	3.736,00
		Positivo	15	1.694,00	2.340,00	3.654,00	5.111,00	8.798,00	4.319,40	592,23
Outros	Negativo	Negativo	19	1.853,00	3.328,00	4.389,00	7.104,00	12.750,00	5.487,32	705,99
		Positivo	12	2619,00	4068,00	5382,50	7327,50	13755,00	6195,92	878,54
	Positivo	Negativo	1	6.580,00	6.580,00	6.580,00	6.580,00	6.580,00	6.580,00	—
		Positivo	9	4.620,00	5.172,00	7.018,00	11.700,00	14.464,00	8.502,56	1.296,50

Tabela 17 – Medidas descritivas da concentração de linfócitos totais segundo grupo, FCV e gengivite separadamente – São Paulo – 2010

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Q1</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q3</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Erro-padrão</b>
GRUPO	Maine Coon	43	1694,00	3186,00	5334,00	8184,00	14300,00	5865,12	518,81
	Outros	41	1853,00	4080,00	5172,00	7359,00	14464,00	6383,24	523,54
FCV	Negativo	57	1716,00	3848,00	5336,00	7770,00	14300,00	6092,68	432,68
	Positivo	27	1694,00	3500,00	5111,00	8748,00	14464,00	6171,48	699,57
Gengivite	Negativo	43	1853,00	3654,00	5600,00	8256,00	14300,00	6373,19	528,19
	Positivo	41	1694,00	3654,00	5111,00	7359,00	14464,00	5850,39	513,03

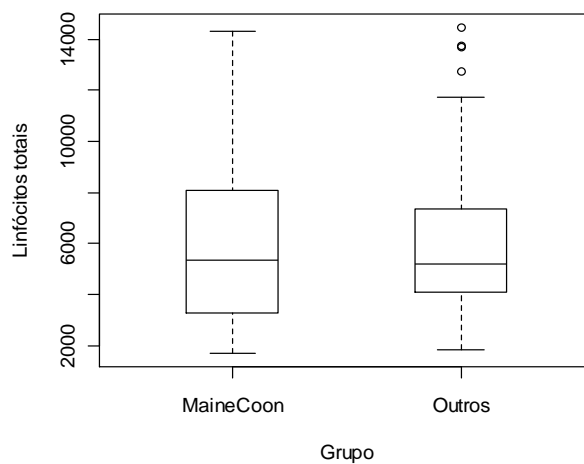


Gráfico 10 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo grupo – São Paulo – 2010

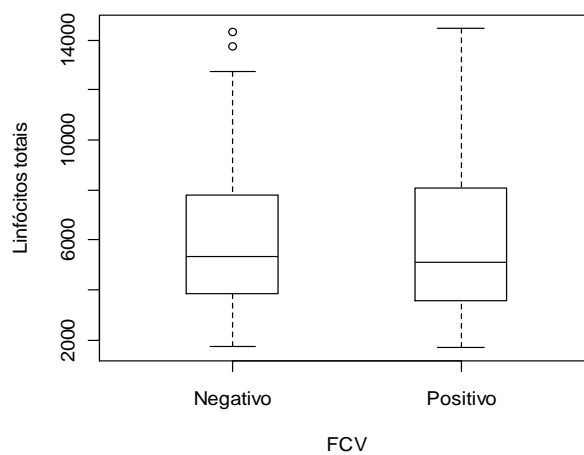


Gráfico 11 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo FCV – São Paulo – 2010

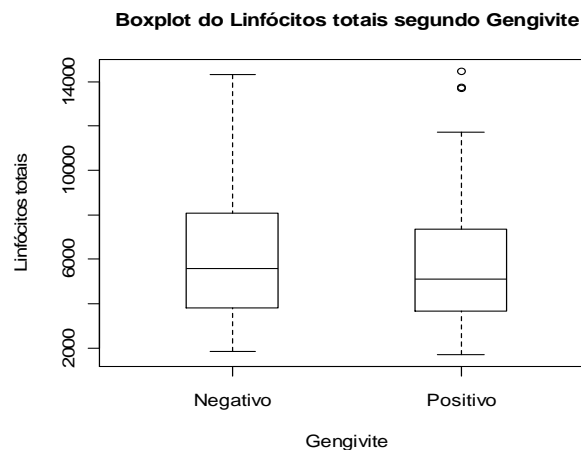


Gráfico 12 – Diagrama de caixas dos valores de linfócitos totais segundo gengivite – São Paulo – 2011

A variável linfócitos totais também foi transformada para aproximar-se da normal, com a análise de variância verificando a influência conjunta dos fatores grupo, FCV e gengivite no  $\log_{10}(\text{linfócitos totais})$ , sendo os resultados observados na tabela 18.

Tabela 18 – Resultados obtidos a partir da Análise de Variância para o  $\log_{10}(\text{linfócitos Totais})$  com os fatores GRUPO, FCV e Gengivite. – Estudo das interações – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
Interação GRUPO × FCV × Gengivite	0,571
Interação GRUPO × FCV	0,654
<b>Interação GRUPO × Gengivite</b>	<b>0,053</b>
Interação FCV × Gengivite	0,576

Analisando estes resultados, é possível verificar uma tendência de interação entre o grupo e a presença de gengivite. Por esse motivo, ajustou-se novamente um

modelo com o efeito principal do FCV e somente com a interação entre o grupo de estudo e a presença ou ausência de gengivite, para proceder com as comparações múltiplas dos animais com e sem gengivite para cada grupo e dos grupos para a presença ou ausência de gengivite (Tabela 19).

Tabela 19 – Resultados obtidos a partir da análise de variância para o  $\log_{10}$ (linfócitos totais) com os fatores FCV e a interação entre grupo e gengivite – São Paulo – 2010

<b>Efeito</b>	<b>p (nível descritivo)</b>
FCV	0,195
<b>gengivite+ × gengivite- para Maine Coons</b>	<b>0,003</b>
gengivite+ × gengivite- para outras raças	0,228
Maine Coons × outras raças para gengivite-	0,161
<b>Maine Coons × outras raças para gengivite+</b>	<b>0,002</b>

De acordo com a análise de variância, a presença ou ausência do FCV na cavidade oral não influi na concentração de linfócitos totais.

Para os animais da raça Maine Coon, a concentração de linfócitos é, em média, menor na presença da gengivite do que na ausência ( $p=0,003$ ). Já para o grupo de animais de outras raças, essa diferença não é significativa ( $p=0,228$ ).

Por outro lado, ao comparar os grupos Maine Coon e gatos de outras raças, observa-se diferença significativa somente para os que tem gengivite, sendo que na presença da doença, os animais da raça Maine Coon possuem as concentrações de linfócitos totais significativamente menores do que os animais de outras raças ( $p=0,002$ ). Já para os que não tem gengivite não há diferenças significativas entre raças ( $p=0,161$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta resultados bastante interessantes frente à ocorrência da gengivite crônica na raça Maine Coon, bem como as influências do FCV e contagens de linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+ e relação CD4+:CD8+.

No tocante a presença das viroses FCV e FHV-1 na patogênese das estomatites crônicas, o presente estudo possui resultados semelhantes aos de outros autores, no que se refere a prevalência do FCV; atualmente têm-se descrito o envolvimento das viroses nas estomatites crônicas, bem como nas glossites ulcerativas e ulceroproliferativas crônicas refratárias ao tratamento (HURLEY; SYKES, 2003; DIEHL; ROSYCHUCK, 1993). A incidência da infecção pelo FCV nos gatos com gengivite-estomatite-faringite crônica, relatada em vários estudos, varia de 20 a 90%, no entanto, não se sabe ao certo qual o real envolvimento do FCV na etiologia da gengivite (ADDIE et al., 2003; LOMER; VERSTRAETE, 2003; DIEHL; ROSYCHUCK, 1993).

No presente estudo, não houve diferença estatística frente à ocorrência do FCV em gatos da raça Maine Coon e em gatos de outras raças, portadores de gengivite crônica. O calicivírus teve relação estatisticamente significativa nos casos de gengivite crônica ( $p < 0,001$ ), não existindo diferentes graus de interação segundo o grupo racial.

Não existiam na literatura veterinária, até a confecção do presente estudo, informações acerca da predisposição que um felino portador do FCV em cavidade oral teria no desenvolvimento da gengivite; com os dados obtidos pôde-se chegar em um valor de "odds ratio" de 18,8. Ou seja, um gato portador do FCV na cavidade oral possui 18,8 vezes mais chance de desenvolver gengivite crônica do que gatos que não possuem o vírus na cavidade oral. Dados como este correlacionam diretamente o FCV na patogênese da gengivite crônica; no entanto, os reais mecanismos patogênicos ainda permanecem incertos (DIEHL; ROSYCHUCK, 1993; ADDIE et al., 2003; LOMER; VERSTRAETE, 2003)

Os gatos que se recuperam da doença respiratória do trato anterior podem se tornar carreadores crônicos do vírus em tecido da orofaringe, chamado de estado de

portador de FCV. O vírus é eliminado continuamente deste local, embora a magnitude da eliminação varie com o tempo e entre indivíduos. Esses gatos podem servir como fonte de infecção para outros gatos susceptíveis. Em muitos gatos, a eliminação do vírus termina semanas a meses após a infecção, mas em um pequeno número de gatos, a eliminação dura a vida toda (HURLEY; SYKES, 2003). No entanto, esta hipótese jamais conseguiu ser reproduzida experimentalmente (RADFORD et al., 2000)

Lomer e Verstraete (2003) citam que 88% dos gatos estudados, portadores de gengivite-estomatite crônica, apresentavam infecção pelo FCV e herpesvírus do tipo 1 concomitantemente. Diferentemente do ocorrido no trabalho anteriormente citado, somente um animal com gengivite crônica teve o FHV-1 isolado do tecido gengival no referente estudo. Não se justificaria tal fato pelos animais do presente estudo serem originários de criatórios diferentes, pois ambas as viroses (FCV e FHV-1) são amplamente encontradas em criatórios de felinos, sendo assim esperado que ambas fossem encontradas na mesma proporção entre os felinos estudados. Tal fato também pode ser indício da correlação do FCV na patogênese da gengivite crônica dos felinos.

Os dados aqui apresentados com relação ao número de linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, bem como relação CD4+:CD8+ também são inéditos, não existindo na literatura veterinária consultada dados acerca das alterações ligadas a essas variáveis em felinos.

Em humanos, estas variáveis, entre inúmeras outras, são bastante estudadas em casos de periodontite juvenil, periodontite crônica, gengivite juvenil e periodontite de rápida progressão (KINANE; JOHNSTON; EVANS, 1989; TAKAHASHI et al., 1995; MATHUR; MICHALOWICZ, 1997; EMINGIL et al., 2001; ERCIYAS et al., 2006).

No tocante aos linfócitos totais, humanos com periodontite crônica e com periodontite juvenil, quando comparados a indivíduos com o periodonto hígido, possuem menor resposta linfocitária em células de sangue periférico (AMER et al., 1990). Diferenças entre populações de linfócitos periféricos, no entanto, são discordantes, não existindo consenso sobre as reais alterações linfocitárias (KATZ et al., 1988; KINANE; JOHNSTON; EVANS, 1989; NAGASAWA et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1995; MATHUR; MICHALOWICZ, 1997). No presente estudo, entre os animais da raça Maine Coon, aqueles que possuíam gengivite crônica eram

estatisticamente mais linfopênicos ( $p=0,003$ ) quando comparados aos animais da mesma raça sem gengivite crônica; na comparação entre grupos de raças diferentes, portadores de gengivite, o achado anterior se manteve, sendo animais da raça Maine Coon estatisticamente mais linfopênicos ( $p=0,002$ ) quando comparados a animais de outras raças.

Tendo em vista que a presença do FCV na cavidade oral não influi no número total de linfócitos, tal achado remete em possível correlação com a gengivite crônica do Maine Coon. A real correlação deste achado ainda é incerta, no entanto, animais desta raça específica com gengivite crônica são linfopênicos; tal fato poderia predispor a menor resposta celular, suscitando menor controle frente à microbiota oral, originando maior replicação bacteriana de espécies não patogênicas e patogênicas, podendo resultar em grande estímulo inflamatório. No entanto, é importante a análise de subpopulações celulares para melhor discussão deste fato.

As alterações no número relativo e absoluto das subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ são tidos como sinal de alteração na regulação do sistema imune. Estudos nas concentrações de linfócitos TCD4+, TCD8+ e na relação CD4+:CD8+ de humanos com gengivite e doença periodontal possuem resultados bastante discrepantes; em grande parte dos trabalhos, não existem alterações significativas entre essas variáveis, sejam nos quadros juvenis, periodontites agudas ou crônicas. Enquanto alguns relatos mostram que a relação CD4+:CD8+ está diminuída em humanos com quadro crônico, periodontite juvenil e periodontite de rápida progressão, outros mostram que esta relação é elevada quando comparada a pacientes hígidos. Quando presente, a elevada relação CD4+:CD8+ ocorre em virtude da diminuída concentração de CD8+, embora este achado nem sempre seja consistente (KATZ et al., 1988; KINANE; JOHNSTON; EVANS, 1989; CELENLIGIL; KANSU; ERATALAY, 1990; AFAR; ENGEL; CLARK, 1992; NAGASAWA et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1995; MATHUR; MICHALOWICZ, 1997).

Os resultados conflitantes destes dados em humanos podem ocorrer em virtude da grande variabilidade de valores dentro de pacientes de um mesmo grupo de doentes, variabilidade dentro dos grupos controle e influência hormonal em indivíduos adolescentes e jovens.

Entre os animais estudados, da raça Maine Coon, encontrou-se um padrão de alteração celular das subpopulações de linfócitos TCD4+, diferindo dos dados encontrados em humanos; Maine Coons com gengivite crônica possuem menor



concentração de linfócitos TCD4+ que animais da mesma raça sem gengivite ( $p=0,02$ ). Entre animais de outras raças, com e sem gengivite, esta diferença não foi encontrada.

Em virtude do FCV não ter influência frente à concentração de linfócitos TCD4+, podemos pressupor que este fato tem correlação específica com a enfermidade na raça supracitada. De fato, em humanos adultos portadores do HIV, aproximadamente 70% desenvolvem gengivite necrótica ulcerativa (GNU) em quadros de baixas concentrações de linfócitos TCD4+. Existe correlação estatística entre baixos níveis da célula e presença da GNU (SHANGASE; FELLER; BLIGNAUT, 2004). Okunseri et al. (2003), em estudo com crianças portadoras do HIV mostram que existe correlação estatisticamente positiva entre a gengivite e baixas contagens de TCD4+. Visto dados como este, os autores supra-citados correlacionam a ocorrência da gengivite com as baixas taxas de CD4+, caracterizando o fato como responsável pelo aparecimento das lesões, sem no entanto saber sua real patogênese. A presença de quadros gengivais em humanos é tida como progressão da síndrome e piora da imunossupressão, além de ser uma fator de prognóstico ruim (HOWELL et al., 1996; RAMOS-GOMEZ et al., 2000; SANTOS et al., 2001).

A presença de candidíase oral foi diretamente relacionada às contagens baixas de linfócitos T CD4+ em humanos portadores do HIV, sendo utilizada como indicador de progressão da doença (RAMOS-GOMEZ et al., 2000; KERDPON et al., 2004).

Os Maine Coons com quadro oral crônico possuem menores valores de TCD4+ quando comparados a gatos da mesma raça sem doença oral. O mesmo fato não foi observado em animais de outras raças. Também se pôde observar que Maine Coons com gengivite tem menor relação CD4+:CD8+ do que Maine Coons hígdos e do que gatos de outras raças com gengivite crônica. Frente a isso, parece existir alguma relação entre os menores níveis de linfócitos totais, TCD4+ e CD4+:CD8+, e a presença da gengivite, na raça estudada. Não se sabe, ao certo, se existe esta relação realmente pode estar implicada, e até que ponto pode ser mensurada somente pelos parâmetros de linfócitos totais, TCD4+, TCD8+ e da relação CD4+:CD8+.

Embora não relatado anteriormente na literatura consultada, parece existir nos animais estudados uma alteração do sistema imune em seu componente celular, na raça Maine Coon, o que parece predispor a gengivite crônica. Esta alteração pode

ter, hipoteticamente, um caráter genético e específico da raça abordada, já que os animais de outras raças, também portadores de gengivite crônica, não apresentavam tais alterações. Embora a afirmação de tal fato seja muito precoce e sem embasamento científico comprobatório na atualidade, sua suposição é perfeitamente cabível. No entanto, outras doenças que podem, por ventura, surgir em animais com menor componente imune celular, não possuem em sua maior representatividade racial o Maine Coon (como a peritonite infecciosa felina nas raças Persa e Bengal, por exemplo) (PEDERSEN, 2009).

Na atualidade, o principal tratamento empregado para o controle das gengivites crônicas em gatos, é o uso de glicocorticóides (HARVEY, 1994). Classicamente, os efeitos imunossupressores desses fármacos têm limitado sua utilização em pacientes felinos ou mesmo em humanos, com doenças que comprometam direta ou indiretamente a imunidade. Os glicocorticóides podem interferir na resposta imunológica celular de diferentes maneiras, sendo a mais importante à diminuição da blastogênese dos linfócitos T, determinando uma diminuição transitória no número de células CD4+ e CD8+. Além disso, esses fármacos também inibem a resposta imunológica celular pela diminuição efetiva da apresentação do antígeno às células T (COHN, 1997; SAUMA et al., 2002).

Em virtude de tais fatores, o uso de glicocorticóides no tratamento das gengivites crônicas de animais da raça Maine Coon deve ser feito com cautela, visto que estes animais possuem baixa resposta imune celular, quando comparados a animais de outras raças.

Isso remete a necessidade de novos estudos frente a diferentes modalidades terapêuticas para o tratamento de tal enfermidade, preferencialmente aquelas que não utilizem glicocorticóides, visando evitar maior comprometimento da imunidade celular destes animais, e conseqüentemente, evitar o aparecimento de outras moléstias comuns em animais com comprometimento imune celular.

## 6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste estudo permite-nos concluir que:

- O calicivírus felino está altamente relacionado à ocorrência de gengivite, independentemente da raça estudada.
- Não existe maior prevalência do calicivírus felino em animais da raça Maine Coon, quando comparados a animais de outras raças.
- A chance de um animal portador do calicivírus, em cavidade oral, de desenvolver gengivite crônica é 18,8 vezes maior do que os que não possuem o vírus na cavidade oral.
- O efeito do calicivírus não é significativo nas alterações de nenhuma das variáveis celulares estudadas (linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+ e relação CD4+:CD8+).
- Animais da raça Maine Coon com gengivite crônica possuem menor concentração de linfócitos totais, quando comparados a Maine Coons sem doença oral.
- Animais da raça Maine Coon com gengivite crônica possuem menor concentração de linfócitos totais, quando comparados a animais de outras raças com gengivite crônica.
- Animais da raça Maine Coon com gengivite crônica possuem menores níveis de linfócitos TCD4+, quando comparados a Maine Coons sem doença oral.
- Não existe alteração significativa dos linfócitos TCD8+ em nenhuma das variáveis estudadas.
- Animais da raça Maine Coon com gengivite crônica possuem menor relação CD4+:CD8+, quando comparados a Maine Coons sem doença oral.
- Animais da raça Maine Coon com gengivite crônica possuem menor relação CD4+:CD8+, quando comparados a animais de outras raças com gengivite crônica.

## REFERÊNCIAS

ADDIE, D. D.; RADFORD, A.; YAM, P. S.; TAYLOR, D. J. Cessation of feline calicivirus shedding coincident with resolution of chronic gingivostomatitis in a cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 44, p. 176 – 176, 2003.

AFAR, B.; ENGEL, D.; CLARK, E.A. Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis. **Journal of Periodontology Research**, v. 27, p. 126–133, 1992.

AMER, A.; SINGH, G.; DARKE, C.; COLBY, A. E. Spontaneous lymphocyte proliferation in severe periodontal disease: role of T and B cells. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 19, p. 49–52, 1990.

BEEBE, A. M.; DUA, N.; FAITH, T. G.; MOORE, P. F.; PEDERSEN, N. C.; DANDEKAR, S. Primary stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. **Journal of Virology**, v. 68, n. 5, p.3080-3091, 1994.

BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **Clinical Microbiology Review**, v. 8, n. 1, p. 87-112, 1995.

BIRGEL, E.H. Hematologia Clínica Veterinária. In. CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA. 1982, São Paulo, **Anais: 1982**, p. 50.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CEBALLOS-SALOBRENA, A.; GAITAN-CEPEDA, L. A.; CEBALLOS-GARCIA, L.; LEZAMA-DEL VALLE, D. Oral lesions in HIV/AIDS patients undergoing highly active antiretroviral treatment including protease inhibitors: a new face of oral AIDS? **AIDS Patient Care**, v. 14, n. 12, p. 627-635, 2000.

CELENLIGIL, H.; KANSU, E.; ERATALAY, K. Juvenile and rapidly progressive periodontitis. Peripheral blood lymphocytes subpopulations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, p. 207–210, 1990.

COHN, L. A. Glucocorticosteroids as immunosuppressive agents. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 12, n. 3, p.150-156, 1997.

CHOMKSINSKY, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

DEIHL, K.; ROSYCHUCK, R. A. W. Feline gingivitis-stomatitis-pharyngitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 1, p.139-153, 1993.

DIEHLA, U.; MATHIASON-DUBARD, C.K.; O'NEIL, L.L.; HOOVER, E.A. Longitudinal assessment of feline immunodeficiency virus kinetics in plasma by use of a quantitative competitive reverse transcriptase PCR. **Journal of Virology**, v. 69, n. 10, p.2328-2332, 1995.

DOWERS, K. L.; HAWLEY, J. R.; BREWER, M. M.; MORRIS, A. K.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Association of Bartonella species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 4, p.314–321, 2009.

EMINGIL, G.; KARAARSLAN, F.; KESKINOĞLU, A.; COKER, I.; ATILLA, G. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in generalised aggressive and chronic periodontitis patients. **Journal of International Academy of Periodontology**, vol. 3, n. 4, p. 87–94, 2001.

ERCIVAS, K.; ORBAK, R.; KAVRUT, F.; DEMIR, T.; KAVA, H. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 41, n. 3, p.165-170, 2006.

FLEISS, J. L. **Statistical method for rate and proportion**, 2<sup>nd</sup> Ed., New York: John Wiley & Sons, 1981.

FROST, P.; WILLIAMS, C. A. Feline dental disease. **Veterinary Clinics of North America :Small Animal Practice**, v. 16, p. 851-873, 1986.

GASKELL, R.; DAWSON, S.; RADFORD, A.; THIRY, E. Feline herpesvirus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 337-354, 2007.

GASKELL, R. M.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Intractable feline stomatitis. **Veterinary Annual**, v. 17, p.195-199, 1977.

GASKELL, R. M.; DAWSON, S.; RADFORD, A. Feline respiratory disease. In: GREENE C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd. ed. St. Louis: Saunders Elsevier Inc., 2006, p.145-154.

GRUFFYDD-JONES, T. J. Gingivitis and Stomatitis. In AUGUST, J. R. **Consultations in feline internal medicine**. Philadelphia: WB Saunders, 1991, v. 3, p.397-402.

HARBOUR, D. A.; HOWARD, P. E.; GASKELL, R. M. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. **Veterinary Record**, v. 128, n. 4, p. 77-80, 1991.

HARVEY, C. E. Oral inflammatory diseases in cats. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 585-591, 1991.

HARVEY, C. E. Oral and dental diseases. In SHERDING, R. G. **The cat: Diseases and clinical management**. 2 ed. New York: Churchill-Livingstone, 1994. p. 1117-1151.

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virology Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, 1998.

HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression** 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: John Wiley & Sons, 1976. p.75-118.

HOWELL, R. B.; JANDINSKI, J. J.; PALUMBO, P.; SHEY, Z.; HOUPPT, M. I. Oral soft tissue manifestations and CD4 lymphocyte counts in HIV-infected children. **Pediatric Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 117-120, 1996.

HURLEY, K. E.; PESAVENTO, P. A.; PEDERSEN, N. C.; POLAND, A. M.; WILSON, E.; FOLEY, J. E. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 2, p. 241-249, 2004.

HURLEY, K.F.; SYKES, J. E. Update on feline calicivirus: new trends. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 759-772, 2003.

JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 99-107, 1999.

JUNQUEIRA-JORGE, J. **Estudo dos fatores de risco da leucemia viral felina no município de São Paulo**: 2005. 42p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KATZ, J.; GOULTSCHIN, J.; BENOLIEL, R.; SCHLESINGER, M. Peripheral T lymphocytes subsets in rapidly progressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 15, p. 266–268, 1988.

KERDPON, D.; PONGSIRIWET, S.; PANGSOMBOON, K.; IAMAROON, A.; KAMPOO, K.; SRETRIRUTCHAI, S.; GEATER, A.; ROBISON, V. Oral manifestations of HIV infection in relation to clinical and CD4 immunological status in northern and southern Thai patients. **Oral Diseases**, v. 10, p. 138-144, 2004.

KINANE, D. F.; JOHNSTON, R. A.; EVANS, C. W. Depressed helper to suppressor T-cell ratios in early-onset forms of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 24, p. 161-164, 1989.

KNOWLES, J. O.; GASKELL, R. M.; GASKELL, C. J.; HARVEY, C. E.; LUTZ, H. Prevalence of feline calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. **Veterinary Record**, v. 124, n. 13, p. 336-338, 1989.

KNOWLES, J. O.; MCARDLE, F.; DAWSON, S.; CARTER, S. D.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 3-4, p. 205-219, 1991.

LOMMER, M. J.; VERSTRAETE, F. J. M. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 131-134, 2003.

LYON, K. F. Gingivostomatitis, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, p. 891-911, 2005.

MARSILIO, F.; MARTINO, B. D.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 1-7, 2005.

MATHUR, A.; MICHALOWICZ, B. S. Cell mediated immune system regulation in periodontal diseases. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 8, p. 76 – 89, 1997.

NAGASAWA, T.; NITTA, H.; WATANABE, H.; ISHIKAWA, I. Reduced CD8+ peripheral blood T lymphocytes in rapidly progressive periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 40, p. 605–608, 1995.

NETER J.; KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C.J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**. 4. ed. McGraw-Hill, 1996.

ODDEN, K.; SCHENCK, K.; HURLEN, B. High numbers of T cells in gingiva from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection, **Journal Oral Pathology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 413-419, 1995.

OKUNSERI, C.; BADNER, V.; WIZNIA, A.; ROSENBERG, M. Prevalence of oral lesions and percent CD4+ lymphocytes in HIV-infected children on antiretroviral therapy. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 17, n. 1, p. 5 – 11, 2003.

PATTON, L.L. Sensitivity, specificity, and positive predictive value of oral opportunistic infections in adults with HIV/AIDS as markers of immune suppression and viral burden. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 90, n. 2, p.182-188, 2000.

PEDERSEN, N. C.; ELLIOTT, J. B.; GLASGOW, A.; POLAND, A.; KEEL, K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 281-300, 2000.

PEDERSEN, N. C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963 – 2008. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 4, p.225-258, 2009.

POULET, H.; BRUNET, S.; SOULIER, M.; LEROY, V.; GOUTEBROZE, S.; CHAPPUIS, G. Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies. **Archives of Virology**, v. 145, n. 2, p. 243-261, 2000.

RADFORD, A. D.; DAWSON, S.; WHARMBY, R.; RYVAR, R.; GASKELL, R. M. Comparison of serological and sequence-based methods for typing feline calicivirus isolates from vaccine failures. **The Veterinary Record**, v. 146, n.5, p.117 – 123, 2000.



RADFORD, A. D.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 556-564, 2009.

RADFORD, A. D.; COYNE, K. P.; DAWSON, S.; PORTER, C. J.; GASKELL, R. M. Feline calicivirus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 319-335, 2007.

RAMOS-GOMEZ, F. J.; PETRU, A.; HILTON, J. F.; CANCHOLA, A. J.; WARA, D.; GREENSPAN, J. S. Oral manifestations and dental status in paediatric HIV infection. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 3-11, 2000.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M.K.; LUCAS, S.R.R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats from São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 3, p. 152-155, 1997.

REYNOLDS, B. S.; POULET, H.; PINGRET, J. L.; JAS, D.; BRUNET, S.; LEMETER, C.; ETIEVANT, M.; BOUCRAUT-BARALON, C. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 633-644, 2009.

SANTOS, L. C.; CASTRO, G. F.; DE SOUZA, I. P.; OLIVEIRA, R. H. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. **Brazilian Dentistry Journal**, v. 12, n. 2, p. 135-138, 2001.

SAUMA, D.; MORA, J. R.; FIEMO, A.; MORATES, J.; HERZOG, C.; BUCKEL, E.; ROSEMBLATT, M.; BONO, M. R. Low-dose prednisone accounts for a transient reduction on CD4+ and CD8+ T cells in renal transplant patients under triple therapy. **Transplantation Proceedings**, v. 34, n. 8, p. 3183-3184, 2002.

SHANGASE, L.; FELLER, L.; BLIGNAUT, E. Necrotising ulcerative gingivitis/periodontitis as indicator of HIV-infection. **South African Dental Journal**, v. 59, n. 3, p.105–108, 2004.

SCHORR-EVANS, E. M.; POLAND, A.; JOHNSON, W. E.; PEDERSEN, N. C. An epizootic oh highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 4, p. 217-226, 2003.

SKALERIC, U.; KOVAK-KAVCIC, M. Some risk for the progression of periodontal disease. **Journal International Academy Periodontal**. v. 2, n. 1, p. 19-23, 2000.

SIMS, T. J.; MONCLA, B. J.; PAGE, R. C. Serum antibody response to antigens of oral gram-negative bacteria by cats with plasma cell gingivitis-pharyngitis, **Journal of Dentistry Research**, v. 69, n. 3, p. 877-882, 1990.

SYKES, J. E.; ALLEN, J. L.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G. F. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and Chlamydia psittaci mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 95-108, 2001.

TAKAHASHI, K.; NAGAI, A.; SATOH, N.; KURIHARA, H.; MURAYAMA, Y. Studies on the phenotypic and functional characterization of peripheral blood lymphocytes from patients with early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 66, p. 391 – 396, 1995.

TENORIO, A. P.; FRANTI, C. E.; MADEWELL, B. R.; PEDERSEN, N. C. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 29, n. 1-2, p. 1-14, 1991.

THIEL, H. J.; KÖNIG, M. Caliciviruses: an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 55-62, 1999.

WATERS, L.; HOPPER, C. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Chronic gingivitis in a colony of cats infected with feline immunodeficiency virus and feline calicivirus. **The Veterinary Record**, v. 132, p. 340-342, 1993.

WEIGLER, B. J.; BABINEAU, C. A.; SHERRY, B.; NASISSE, M. P. High sensitive polymerase chain reaction assay for active and latent feline herpesvirus-1 infection in domestic cats. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 13, p. 335-338, 1997.

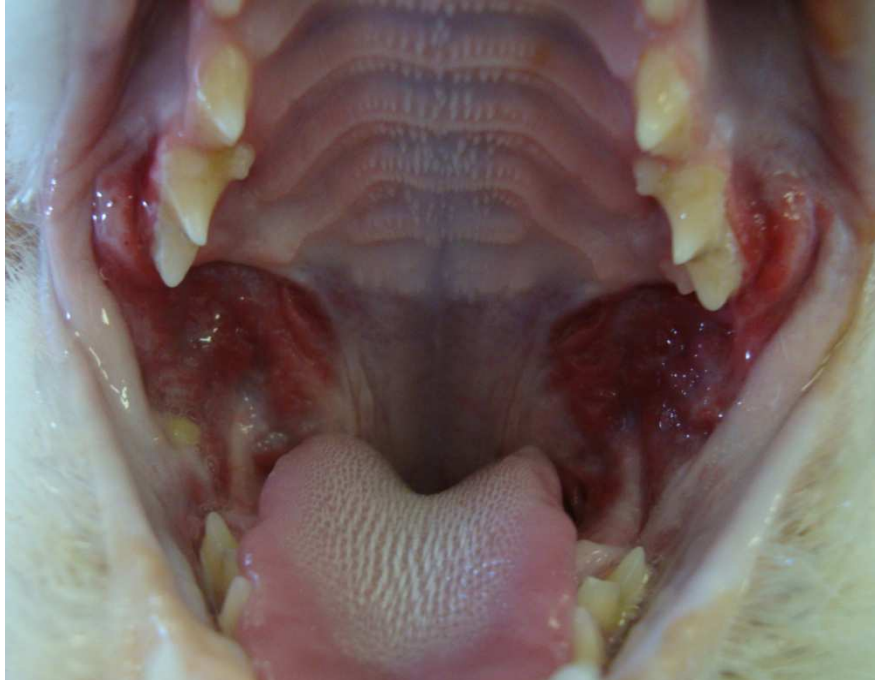
WILLIS, A.M. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.30, n.5, p.971-986, 2000.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible modes of transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 2, p. 213-220, 1989.

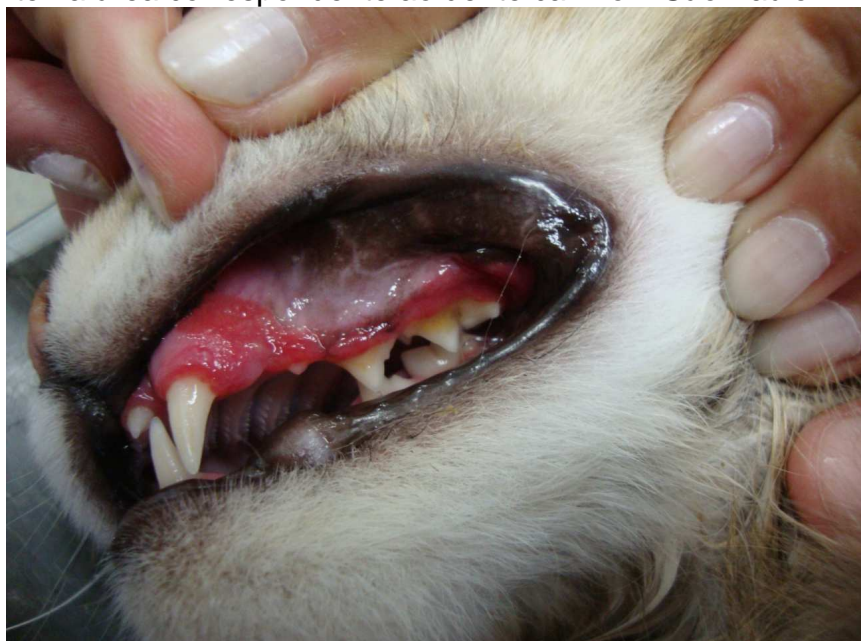
ZENGER, E. Clinical findings in cats with feline immunodeficiency virus. **Feline Practice**, v. 18, p. 25-28, 1990.

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Imagem da mucosa oral de um gato da raça Maine Coon apresentando gengivite grau 3. Notar hiperemia em região de fauces e início de ulceração – São Paulo – 2011



APÊNDICE B – Imagem da mucosa oral de um gato da raça Maine Coon apresentando gengivite grau 2. Notar hiperemia moderada em toda região gengival, principalmente na área correspondente ao dente canino – São Paulo – 2011



APÊNDICE C – Imagem da cavidade oral de um gato da raça Maine Coon com gengivite grau 4. Animal com hiperemia, hiperplasia e ulceração gengival, com acometimento concomitante da região das fauces – São Paulo – 2011



APÊNDICE D – Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE C. Notar intensa hiperemia e hiperplasia gengival, bem como estria de material purulento – São Paulo – 2011

