CARLOS ALBERTO GERALDO JUNIOR

**Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus
felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas
naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina**

São Paulo

2010

CARLOS ALBERTO GERALDO JUNIOR

Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina

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 Jr.

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 Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2306
FMVZ

Geraldo Junior, Carlos Alberto

Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina / Carlos Alberto Geraldo Junior. -- 2010.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Archivaldo Reche Jr.

1. Gatos. 2. Calicivírus felino. 3. Herpesvírus felino tipo 1. 4. Imunodeficiência felina. 5. Gengivite. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da ocorrência de calicivírus e herpesvírus em gatos domésticos com gengivite crônica e naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência dos felinos por meio da PCR", protocolado sob o nº1456/2008, utilizando 40 (quarenta) 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 calicivirus and herpesvirus in domestic cats with chronic gingivitis and naturally infected with feline immunodeficiency virus through PCR", utilizing 40 (forty) cats, protocol number 1456/2008, 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: GERALDO JR, Carlos Alberto

Título: Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos Alberto e Cristiane, meus maiores exemplos de união, perseverança, dedicação, amor e que sempre deram todo apoio necessário em todas as fases da minha vida. Vocês me ensinaram a ser forte, confiante e determinado para que pudesse atingir todos meus objetivos. EU AMO VOCÊS!

À minha esposa Nathalia, pelo companheirismo, incentivo e paciência durante todos esses anos. Obrigado pelo apoio, pela colaboração inclusive abdicando dos finais de semana para me acompanhar nas coletas de materiais e principalmente pelo amor incondicional. Com você ao meu lado pude me manter motivado para conseguir atingir mais este objetivo.

Ao meu avô Calil José Nassur, por ter acreditado nos meus ideais e investido tanto em minha formação. Só mediante aos seus esforços, dedicação e apoio isto tudo se tornou realidade. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Luís Felipe e Samira que, apesar da distância e das dificuldades, estivemos e estaremos sempre juntos para alcançarmos nossos objetivos.

A todos os gatos que participaram desse estudo, doando um pouco de si e de sua paciência, para que pudéssemos obter o material necessário para conclusão desse trabalho. Vocês são considerados seres irracionais mas aprendi que a racionalidade não está relacionada simplesmente ao fato de raciocinar ou não mas também na maneira como agimos, o que torna-os “superiores”.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me proporcionou o dom da vida e me deu forças para permanecer firme na busca dessa conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Archivaldo Reche Jr., por acreditar sempre em meu potencial e me dar a oportunidade para realização deste trabalho e a conquista deste título. Obrigado pelo incentivo, pela paciência, confiança, pelos momentos de descontração e de cobrança e pelos inúmeros conhecimentos que foram e continuam sendo transmitidos. Você sempre será um grande ídolo!

Ao Prof. Dr. Ricardo Duarte Silva, grande amigo, incentivador, conselheiro e parceiro. Com você como meu professor aprendi não só a ser um bom médico veterinário, como também os verdadeiros valores dentro dessa profissão. Sem você, não teria chegado até aqui. Obrigado de coração por tudo, sempre!

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, exemplo de dedicação e sabedoria aliada à simplicidade e humildade, virtudes que só encontramos em pessoas realmente especiais e únicas. Você sabe que esse trabalho só foi possível devido a sua colaboração, incentivo permanente e por ter deixado as portas sempre abertas para a sua execução. Minha eterna gratidão e admiração!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Soares Martins que desde antes do surgimento desse projeto me apoiava e incentivava a realização da pós-graduação e prestou auxílio fundamental para a execução deste trabalho e para minha entrada no VPS.

Às Prof^{as} Dras. Márcia Mery Kogika, Mitika Kuribayashi Hagiwara e Silvia Ricci pelo apoio, incentivo e pelas várias “discussões” que melhoraram e enobreceram este trabalho.

À Carmen Salas e Fátima Paiva, pela colaboração ao abrirem as portas dos seus gatis sempre que necessário para as coletas de material, com muita confiança, respeito e paciência.

Às “companheiras de bancada” e amigas do LABMAS, Thaisa Sandri, Sibele Pinheiro, Vanessa Salgado, Gisele Ayres, pela parceria, companheirismo, risadas, “bandejões”, incentivo nos momentos bons e ruins e, principalmente, pela amizade que foi conquistada.

Aos companheiros de pós-graduação, Andreza Ávila, Alexandre G. T. Daniel, Bruno M. Teixeira, Daniela Ramos, Christiane S. Prosser, Patrícia Mosko, Aline S. da Hora, Thaís R. Macedo, Arine Pellegrino, Leila Taranti que estiveram sempre presentes, principalmente nos finais de semana de coletas, dando muito apoio e incentivo.

À Sheila Oliveira, que apesar das broncas diárias, sempre manteve o LABMAS de portas abertas para mim e disposta a ajudar em tudo que precisasse, inclusive na resolução dos problemas.

Aos enfermeiros do HOVET-USP, em especial a Milton Gregório dos Santos pela disposição e ajuda nos finais de semana para a coleta das amostras.

Ao amigo Wagner Sato Ushikoshi, que desde o início da minha carreira profissional foi uma pessoa que acreditou e me deu suporte necessário, inclusive com moradia, para minha formação, sempre com muito incentivo, bom humor e muita paciência.

Aos amigos Leonardo P. Brandão e Maria Alessandra M. Del Barrio (Mammy's), pelas conversas intermináveis, por aturarem minhas “neuroses”, pelo companheirismo, motivação e pela amizade incrível.

Ao casal Estela Gallucci e Flávio Zane pela amizade sincera que perdura por muitos anos e pelas longas conversas que sempre deram motivação para continuarmos no caminho.

À amiga Ana Claudia Balda, que sempre acreditou em meu potencial, me incentivou e deu forças para conseguir alcançar mais esta meta.

À minha amiga e companheira de trabalho Lilia Wang, que teve a disponibilidade de dobrar sua carga de trabalho para que eu pudesse me dedicar integralmente a conclusão deste trabalho.

Ao casal de amigos Renata e Rafael pela convivência sensacional que temos, pelo apoio dado durante todos esses anos e pelo auxílio estatístico prestado pelo Rafael e linguístico pela Renata.

Aos amigos e ex-companheiros de trabalho em Espírito Santo do Pinhal, Paulo R. Martin, João Francisco de A. Mattos, Fabrício de Jesus Brasil, Patrícia Popak e Leandro Teixeira, por todo período de fraternal e harmoniosa convivência, o que serviu de suporte para todo o período da pós-graduação.

Aos amigos Josué Lolli Jr. e Rafael P. Lessa pela amizade ao longo de todos esses anos, que foi fundamental para a sequência deste trabalho.

Ao casal de amigos Camila e Fabrício, pelos momentos de descontração, companheirismo durante as disciplinas, incentivo e pelas boas risadas.

Ao amigo Fernando Felipe de Carvalho, que apesar da distância, nossa amizade sempre será inabalável.

RESUMO

GERALDO JR., C. A. **Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina.** [Occurrence of feline calicivirus and feline herpesvirus type 1 in cats with chronic gingivitis-stomatitis and naturally infected with feline immunodeficiency virus]. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As alterações inflamatórias que afetam a cavidade oral e a gengiva dos felinos são frequentemente observadas na rotina médica e constituem verdadeiro desafio diagnóstico e terapêutico ao clínico. Denomina-se complexo gengivite-estomatite-faringite felina (CGEF) como sendo uma síndrome onde a apresentação clínica comum é a inflamação grave da gengiva e mucosa oral. A etiopatogênese desta doença não está totalmente elucidada mas acredita-se que seja multifatorial. 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. A hipótese do presente estudo é de que a depleção imunológica induzida pelo lentivírus felino (FIV) aumenta o risco de ocorrência do FCV e do FHV-1 e da estomatite-gengivite em gatos. Para tanto, foram realizados 2 experimentos: o primeiro (A) foi delineado para avaliar a ocorrência do FCV e do FHV-1 na cavidade oral de 58 gatos naturalmente infectados pelo FIV ou não, com e sem gengivite, por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR), assim como correlacionar esses achados com as subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e da razão CD4+:CD8+ e o segundo (B) foi desenvolvido para avaliar a correlação do FCV e das subpopulações de linfócitos T CD4+ com os diferentes graus de estomatite-gengivite em 35 gatos naturalmente infectados pelo FIV ou não, divididos em 2 grupos. No experimento A, pôde-se determinar que apenas o FCV está relacionado à inflamação gengival, sendo detectado em 88,9% dos gatos com gengivite. Além disso, a infecção pelo FIV promoveu aumento significativo do número de linfócitos T CD8+ ($p=0,004$) e diminuição da razão CD4+:CD8+ ($p<0,001$). No experimento B, identificou-se que a infecção pelo FIV está associada à ocorrência da

infecção pelo FCV ($p=0,011$), à presença de gengivite ($p=0,022$) e ao grau de gengivite ($p<0,001$), sendo que os gatos infectados pelo FIV foram os que apresentaram graus mais graves de gengivite. Portanto, no grupo dos animais infectados pelo FIV pôde-se observar maior ocorrência do FCV e presença de gengivite. Adicionalmente, o grau de gengivite está diretamente associado à infecção pelo FCV ($p<0,001$), onde os animais positivos para este vírus apresentaram graus mais graves de gengivite. Pelo presente estudo, pôde-se concluir que a ocorrência da infecção pelo FCV está diretamente associada ao CGEF em felinos e que a ocorrência do FCV foi significativa em animais que apresentaram graus mais graves de gengivite. Além disso, os gatos que apresentaram graus mais graves de gengivite, foram os que apresentaram menores valores de linfócitos T CD4+ e maior ocorrência de infecção pelo FCV. Contudo, não é possível saber se a co-infecção pelo FIV e FCV foi responsável pelo agravamento da gengivite e da condição imunológica dos gatos ou se a disfunção do sistema imune causada pelo FIV predispôs a infecção pelo FCV, levando a piora das lesões orais.

Palavras-chave: Gatos. Calicivírus felino. Herpesvírus felino tipo 1. Imunodeficiência felina. Gengivite.

ABSTRACT

GERALDO JR., C. A. **Occurrence of feline calicivirus and feline herpesvirus type 1 in cats with chronic gingivitis-stomatitis and naturally infected with feline immunodeficiency virus.** [Avaliação da ocorrência do calicivírus felino e do herpesvírus felino tipo 1 em gatos com gengivite-estomatite crônicas naturalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina]. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The inflammation that affects the oral cavity and the gingiva of felines are frequently observed in the medical practice and constitute a true diagnosis and therapy challenge to the physician. This condition is referred to as feline gingivitis-stomatitis-pharyngitis complex (FGSC) and it is a syndrome in which the common clinical profile is a severe gingival and oral mucosa inflammation. The etiopathogenesis of this disease is not completely elucidated but it is believed to be multifactorial. The viruses have been involved as etiologic agents in the feline chronic gingivitis-stomatitis pathogeny, however, the mechanism through which the viral infections participate in the development of the gingival disease of the infected animals remains undetermined. The present study's hypothesis is that the immunedepletion induced by the feline lentivirus (FIV) increases the risk of development of FCV and FHV-1, and stomatitis-gingivitis in cats. In order to do so, two experiments were conducted: the first one (A) was designed to evaluate the occurrence of FCV and FHV-1 in the oral cavity of 58 cats naturally infected by FIV or not, with and without gingivitis, through polymerase chain reaction (PCR), and to correlate this findings with the subpopulations of lymphocytes T CD4+, CD8+ and the ratio of CD4+:CD8+; the second one (B) was developed to evaluate the correlation of the FCV and of the subpopulations of lymphocytes T CD4+ with the different degrees of stomatitis-gingivitis in 35 cats naturally infected by the FIV or not, divided into two groups. In the experiment A, it was possible to determine that only the FCV is related to gingivitis, being detected in 88.9% of the cats with gingivitis. Moreover, the FIV infection promoted a significant increase in the number of lymphocytes T CD8+ ($p=0.004$) and a decrease of the ratio CD4+:CD8+ ($p<0.001$). In the experiment B, the FIV infection is associated to the occurrence of gingivitis due to the FCV ($p=0.011$), to

the presence of gingivitis ($p=0.022$), and to the degree of gingivitis ($p<0.001$), being that the FIV infected cats were the ones that presented the more severe degrees of gingivitis. Therefore, in the group of animals infected by the FIV it was possible to observe a greater occurrence of FCV and the presence of gingivitis. Additionally, the degree of gingivitis is directly related to the FCV infection ($p<0.001$), where the animals that tested positive for this virus presented more severe degree of gingivitis. From the present study, it was possible to conclude that the occurrence of infection due to the FCV is directly related to FGSC in felines and that the occurrence of FCV was significant in animals that presented more severe degrees of gingivitis. Moreover, the cats that presented more severe degrees of gingivitis were the ones that presented lower values of lymphocytes T CD4+ and greater occurrence of FCV infection. However, it is not possible to know whether the co-infection due to the FIV and the FCV was responsible for the worsening of the gingivitis and of the immune condition of the cats, or if the immune system dysfunction caused by the FIV predisposed the FCV infection, leading to the aggravation of the oral lesions.

Key words: Cats. Feline calicivirus. Feline herpesvirus type 1. Feline immunodeficiency. Gingivitis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das frequências das variáveis FCV, FHV1 segundo infecção ou não pelo FIV, São Paulo, 2010.....	42
Tabela 2 -	Distribuição das frequências da gengivite segundo a infecção pelo FIV, FCV e FHV1, São Paulo, 2010.....	43
Tabela 3 -	Resultados da regressão logística que avalia a relação dos fatores conjuntamente com a gengivite, assim como as interações entre eles, São Paulo, 2010.....	43
Tabela 4 -	Medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	45
Tabela 5 -	Medidas descritivas dos valores de linfócitos CD8+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	47
Tabela 6 -	Medidas descritivas da razão CD4:CD8 segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	49
Tabela 7 -	Medidas descritivas da relação de linfócitos totais segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	51
Tabela 8 -	Distribuição das frequências das variáveis FCV, gengivite, grau de gengivite e sexo segundo a infecção ou não pelo FIV, São Paulo, 2010.....	53
Tabela 9 -	Distribuição das frequências das variáveis gengivite, grau de gengivite e sexo segundo a infecção ou não pelo FCV, São Paulo, 2010.....	54
Tabela 10 -	Distribuição das frequências da variável sexo segundo a presença ou não de gengivite, São Paulo, 2010.....	55
Tabela 11 -	Medidas descritivas dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	55
Tabela 12 -	Medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo cada fator separadamente, São Paulo, 2010.....	57

Tabela 13 - Resultados obtidos a partir da análise de variância para os valores de linfócitos T CD4+ com os fatores FIV, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	60
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Diagrama de caixa dos valores de linfócitos T CD4+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	46
Gráfico 2 - Diagrama de caixa dos valores de linfócitos T CD8+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	48
Gráfico 3 - Diagrama de caixas dos valores da razão dos linfócitos T CD4:CD8+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	50
Gráfico 4 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos totais para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite, São Paulo, 2010.....	52
Gráfico 5 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ para as combinações de FIV, FCV e gengivite, São Paulo, 2010.....	56
Gráfico 6 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo a infecção ou não pelo FIV, São Paulo, 2010.....	58
Gráfico 7 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo infecção ou não pelo FCV, São Paulo, 2010.....	58
Gráfico 8 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo presença ou não de gengivite, São Paulo, 2010.....	59
Gráfico 9 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo os diferentes graus de gengivite, São Paulo, 2010.....	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem da cavidade oral de um gato com gengivite grau 4 evidenciando hiperemia das fauces, São Paulo – 2010..... 24
- Figura 2 - Imagem da cavidade oral do gato da ilustração 1 evidenciando a hiperemia gengival, São Paulo - 2010..... 24

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Foto de gel de agarose corado com brometo de etídio após realização de RT-PCR e eletroforese apresentando quatro amostras positivas para o FCV (números 1, 2, 3 e 4), controle negativo (N) e controle positivo (POS) – São Paulo, 2010.....	78
Apêndice B -	Foto de gel de agarose corado com brometo de etídio após realização de NESTED-PCR e eletroforese apresentando sete amostras positivas para o FHV-1 (números 2, 3, 7, 8, 9, 10 e 12), controles negativos (N) e controle positivo (P) – São Paulo, 2010...	79
Apêndice C -	Imagem da mucosa oral de um gato apresentando gengivite grau 2. Notar hiperemia moderada da gengivite na margem dos dentes – São Paulo, 2010.....	80
Apêndice D -	Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE C. Notar hiperemia moderada da gengivite na margem dos dentes e ausência de inflamação das fauces – São Paulo, 2010.....	80
Apêndice E -	Imagem da mucosa oral de um gato apresentando gengivite grau 3. Notar hiperemia e hiperplasia da gengivite na margem dos dentes – São Paulo, 2010.....	81
Apêndice F -	Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE E. Notar hiperemia grave e hiperplasia da gengiva na margem dental e nas fauces – São Paulo, 2010.....	81
Apêndice G -	Imagem da cavidade oral de um gato com gengivite grau 4. Notar hiperemia e hiperplasia graves de toda a gengiva e das fauces e ausência de alguns dentes – São Paulo, 2010.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	COMPLEXO GENGIVITE-ESTOMATITE-FARINGITE (CGEF)	22
2.2	CALIVÍRUS FELINO (FCV)	25
2.3	HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1	27
2.4	VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA DOS FELINOS (FIV)	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	EXPERIMENTO A	33
3.2	EXPERIMENTO B	34
3.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV)	34
3.4	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA DOS FELINOS	35
3.5	REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA O CALICIVÍRUS FELINO (FCV) E HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1 (FHV-1)	35
3.5.1	Coleta de material e conservação	35
3.5.2	Controles positivos e negativos	36
3.5.3	Calicivírus felino (FCV)	36
3.5.3.1	Extração de RNA	36
3.5.3.2	Transcrição reversa (síntese de cDNA; DNA complementar)	36
3.5.3.3	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	37
3.5.4	Herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1)	37
3.5.4.1	Extração de DNA	37
3.5.4.2	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	38
3.6	LEUCOGRAMA	38

3.7	FENOTIPAGEM DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS CD4+ E CD8+ PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.1	EXPERIMENTO A.....	40
4.2	EXPERIMENTO B.....	40
5	RESULTADOS	42
5.1	EXPERIMENTO A.....	42
5.2	EXPERIMENTO B.....	52
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CGEF	Complexo gengivite-estomatite-faringite
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCV	Calicivírus felino
FeLV	Vírus da leucemia felina
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
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
mL	Mililitro
mm ³	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
U	Unidade
VS-FCV	Cepa virulenta de calicivírus felino
µg	micrograma
µL	Microlitro

1 INTRODUÇÃO

As alterações inflamatórias que afetam a cavidade oral e a gengiva dos felinos são frequentemente observadas na rotina médica e constituem verdadeiro desafio diagnóstico e terapêutico ao clínico. Denomina-se complexo gengivite-estomatite-faringite felina (CGEF) como sendo uma síndrome onde a apresentação clínica comum é a inflamação grave da gengiva e mucosa oral (DEIHL; ROSYCHUCK, 1993; LOMMER; VERSTRAETE, 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPLEXO GENGIVITE-ESTOMATITE-FARINGITE (CGEF)

As primeiras descrições na literatura classificavam estas manifestações clínicas de Estomatite felina intratável (GASKELL; GRUFFYDD-JONES, 1977).

Histologicamente, a gengivite crônica dos felinos é classificada, segundo o padrão de células inflamatórias predominantes em: estomatite linfoplasmocítica, estomatite plasmocítica, estomatite ulcerativa crônica, estomatite necrosante e estomatite gengivite faucite crônica (LOMMER; VERSTRAETE, 2003; LYON, 2005).

O complexo gengivite-estomatite felina pode ser comparado com a gengivite ulcerativa necrosante e a 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 predispõem a infecções secundárias, que contribuem para a cronicidade da doença (LOMMER; VERSTRAETE, 2003; LYON, 2005).

Acredita-se que a etiologia do CGEF seja multifatorial, onde bactérias, vírus, nutrição, condições ambientais e de manejo, associadas a fatores genéticos, contribuem para a instalação e manutenção da inflamação gengival. A gengivite sempre precede a periodontite e a periodontite está sempre acompanhada de gengivite, portanto, a partir do momento em que a gengiva torna-se inflamada, há perda de sua integridade e ocorre ulceração dos sulcos gengivais, permitindo que bactérias e suas toxinas (hialuronidases e enzimas lisossomais) atinjam estruturas periodontais profundas. Essas alterações aliadas ao grande fluxo de células inflamatórias para o local afetado irritam a gengiva e começam a desencadear uma reação inflamatória

determinando edema gengival, eritema e friabilidade do tecido (HARVEY, 1991; DEIHL; ROSYCHUCK, 1993; LYON, 2005).

Se o sistema imunológico estiver suprimido, a periodontite pode evoluir rapidamente, predispondo a formação do cálculo dental (LYON, 2005).

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 gradualmente progressiva e 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 com desenvolvimento de lesões proliferativas e ulcerações na orofaringe, arco glossopalatino, gengiva e língua. A inflamação também pode envolver a camada mucosa. Além disso, outros sintomas muito comuns nestas afecções orais são uma halitose intensa, mobilidade dental, disfagia, e em casos extremos, pode levar a um quadro de dor muito intensa e anorexia (DEIHL; ROSYCHUCK, 1993; LOMMER; VERSTRAETE, 2003; LYON, 2005; QUIMBY et al., 2008).

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 manifestações de gengivite; um (1) a gengivite branda, onde se observa uma hiperemia discreta nas margens gengivais; dois (2) é a gengivite moderada, onde o paciente deverá apresentar uma hiperemia gengival bastante evidente, porém sem manifestações de hiperplasia e/ou ulceração gengival; três (3) corresponde à gengivite grave, com hiperemia evidente das margens gengivais, áreas de hiperplasia e/ou ulceração gengival, podendo haver perda de dentes; quatro (4) é a 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 (figuras 1 e 2).

Figura 1 – Imagem da cavidade oral de um gato com gengivite grau 4 evidenciando hiperemia das fauces.

Figura 2 – Imagem da cavidade oral do gato da ilustração 1 evidenciando a hiperemia gengival.

Muitos fatores vêm sendo incriminados e investigados como possíveis causadores ou colaboradores na etiologia desse complexo. Esses fatores podem iniciar diretamente a inflamação ou contribuir indiretamente, alterando o equilíbrio entre a microbiota bacteriana normal e os mecanismos de defesa teciduais do hospedeiro ou em ambos (DEIHL; ROSYCHUCK, 1993)

microbiota bacteriana normal e os mecanismos de defesa teciduais do hospedeiro ou em ambos (DEIHL; ROSYCHUCK, 1993)

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 agentes infecciosos como os vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV), da leucemia felina (FeLV), o herpesvírus felino tipo-1 (FHV-1) e/ou o calicivírus felino (FCV) (TENORIO et al., 1991; DEIHL; ROSYCHUCK, 1993; LYON, 2005; QUIMBY et al., 2008).

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).

2.2 CALICIVÍRUS FELINO (FCV)

O FCV é um patógeno extremamente contagioso e amplamente difundido entre a população felina mundial. Pertence ao gênero *Vesivirus*, da família *Caliciviridae*, que inclui importantes agentes causadores de doenças em homens e em animais. Caracteristicamente, é um vírus pequeno, não-envelopado, de capsídeo esférico e possui em seu genoma uma fita simples de RNA com polaridade positiva, com aproximadamente 7,7 kb (THIEL; KONIG, 1999; GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; RADFORD et al., 2007; PESAVENTO; CHANG; PARKER, 2008; RADFORD et al., 2009).

O capsídeo viral protéico é formado por seis regiões, nomeadas de A a F, baseadas na conservação da sequência genética entre as cepas de FCV, sendo que a região E é a que apresenta maior variação antigênica e é utilizada para estudos de variabilidade. Essa característica de ampla variabilidade antigênica do capsídeo protéico confere ao FCV extrema capacidade de adaptação e surgimento de inúmeras

cepas com diferentes graus de virulência e patogenicidade, porém todas pertencentes ao mesmo sorogrupo (SYKES; STUDDERT; BROWNING, 1998; RADFORD et al., 2007; RADFORD et al., 2009).

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 da doença respiratória causada pelo FCV podem desenvolver infecção persistente na orofaringe, chamado de estado de portador crônico. 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 animais, a eliminação do vírus termina semanas a meses após a infecção, mas em alguns casos a eliminação dura a vida toda, portanto, a prevalência da infecção pelo FCV em gatos saudáveis é grande, alcançando de 8 a 24% (THIEL; KONIG, 1999; HURLEY; SYKES, 2003).

A grande variabilidade antigênica entre as cepas de FCV é a responsável pela diversidade de manifestações clínicas e surgimento de novas síndromes causadas por este vírus (LOMMER; 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; SCHORR-EVANS et al., 2003; HURLEY et al., 2004; REYNOLDS et al., 2009).

No início da década de 1990, alguns autores começaram a descrever a associação da presença do FCV com o desenvolvimento da CGEF (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 CGEF, quando comparados aos gatos do grupo controle (LOMMER; VERSTRAETE, 2003; DOWERS et al., 2009).

2.3 HERPESVÍRUS FELINO TIPO-1 (FHV-1)

O FHV-1 é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*, apresentando distribuição cosmopolita. É um vírus que apresenta dupla fita de DNA em seu genoma e possui envelope, portanto, é pouco resistente às condições ambientais e sensível aos desinfetantes comuns. Existe apenas um sorogrupo de FHV-1, onde as cepas apresentam pequena variação antigênica e, portanto, resultam em uma apresentação clínica relativamente uniforme (GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

As vias de infecção pelo FHV-1 são as mucosas nasal, oral e conjuntival. A replicação viral ocorre predominantemente na mucosa do septo nasal, dos ossos turbinados, nasofaringe e tonsilas, podendo ser detectados na orofaringe após 24 horas da infecção e persistindo por até três semanas. A infecção gera áreas de necrose epitelial multifocais com infiltração neutrofílica e exsudação com fibrina, podendo levar a dano osteolítico em ossos turbinados (GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

As manifestações clínicas relacionados à infecção pelo FHV-1 compreendem alterações inespecíficas como apatia, febre e anorexia, alterações do trato respiratório cranial como espirros frequentes, tosse e secreção nasal e alterações oculares como conjuntivite e intensa secreção ocular. Infecções bacterianas secundárias são comuns e induzem à eliminação de secreção nasal muco-purulento. Menos frequentemente

podem ser detectadas ceratite ulcerativa, sequestro de córnea, úlceras em cavidade oral e dermatite facial. Nesta fase da doença, o vírus pode ser facilmente isolado das mucosas oral, nasal e conjuntival (WEIGLER et al., 1997; GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

Virtualmente, todos os animais que se recuperam do estado de doentes, se tornam portadores do vírus em estado de latência e podem voltar a eliminar o vírus de maneira intermitente durante episódios de reativação, causados por estresse ou pelo uso de glicocorticóides. Estima-se que 80% dos gatos com infecção pelo vírus da imunodeficiência felina tenham infecções latentes pelo FHV-1 (WEIGLER et al., 1997; GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

Alguns autores têm demonstrado a ocorrência do FHV-1 em animais que apresentam CGEF, porém não se conhece o seu real envolvimento nas doenças orais dos felinos (HARGIS; GINN, 1999; LOMMER; VERSTRAETE, 2003). Em humanos é bem reconhecida a gengivite-estomatite herpética, com desenvolvimento de edema em gengiva e lesões ulceradas em lábios, mucosa oral e pele facial, além de ser incriminado como causa de base nas periodontites (LOMMER; VERSTRAETE, 2003).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores procuraram avaliar a implicação e a ocorrência dos herpesvírus nas doenças orais em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência (HIV), mostrando maior ocorrência e envolvimento direto deste vírus no desenvolvimento das lesões na cavidade oral de humanos portadores do HIV (SLOTS; CONTRERAS, 2000; GRANDE et al., 2008).

Atualmente vários estudos têm sido realizados para determinar a aplicabilidade da reação de polimerização em cadeia (PCR) para o FHV-1. Nesses trabalhos foi possível demonstrar excelente sensibilidade e especificidade da PCR na detecção do FHV-1 em animais doentes e naqueles com baixa carga viral e infecção latente, tornando-se uma ferramenta extremamente útil para fins diagnósticos e de pesquisa (HARA et al., 1996; STILES et al., 1997a; WEIGLER et al., 1997; SYKES et al., 2001; MARSILIO, F. et al., 2005; STILES; POGRANICHNIY, 2008).

Outros autores conseguiram determinar sensibilidade e especificidade superiores da PCR em comparação às técnicas de isolamento viral e de

imunofluorescência, tanto em animais doentes como em gatos com infecção latente (STILES et al., 1997b; BURGESSER et al., 1999).

2.4 VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA DOS FELINOS (FIV)

Dentre os Retrovírus capazes de infectar e induzir doenças em felinos, o FIV, pertencente à subfamília dos Lentivírus, tem recebido especial atenção desde sua identificação em 1986, 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. O que torna o felino infectado pelo FIV um modelo de estudo bastante eficaz, principalmente no que diz respeito à avaliação de drogas antivirais, na patogenia e curso da doença, bem como nos testes vacinais (BENDINELLI et al., 1995; RECHE JR.; HAGIWARA; LUCAS, 1997).

A maior parte das infecções pelo FIV ocorre pela mordida de um gato infectado, havendo inoculação de partículas virais ou de células infectadas pelo vírus, portanto, a infecção pelo FIV ocorre principalmente em gatos machos, inteiros e de vida livre, que frequentemente se envolvem em brigas. A transmissão via secreções oronasais e venérea é incomum, porém já foi documentada em estudos experimentais e pode ocorrer também da mãe para os filhotes dentro do útero, durante o parto ou na lactação pelo colostro ou leite (DUNHAM; GRAHAM, 2008; HOSIE et al., 2009).

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, sendo determinadas três fases da doença. Quando os gatos se infectam, naturalmente ou são

inoculados experimentalmente, o FIV se replica em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T CD4+, sendo que as partículas virais são encontradas no plasma num período que varia de três a quatro semanas após a infecção. Linfócitos T CD8+ citotóxicos FIV- específicos podem ser detectados no sangue dentro de uma semana de infecção. Em gatos experimentalmente infectados, as manifestações clínicas como letargia, febre intermitente e linfonodomegalia 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, na qual a carga viral plasmática permanece estável, porém há intensa atividade imunológica antiviral. Podemos observar uma progressiva diminuição da razão de linfócitos CD4+:CD8+ devido ao declínio progressivo do número de linfócitos T CD4+ associado ou não ao aumento do número de CD8+. Esta fase pode se estender por muitos anos sem que o felino apresente quaisquer anormalidades clínicas. A terceira fase, ou fase terminal, é caracterizada por incompetência imunológica, aumento da carga viral plasmática, infecções bacterianas e fúngicas oportunistas, como infecções respiratórias crônicas e infecções de trato urinário. Outras doenças incluem enterite crônica, dermatopatias, manifestações neurológicas e neoplasias (HARBOUR; CANEY; SPARKES, 2004; DUNHAM; GRAHAM, 2008; ELDER et al., 2008; MURPHY et al., 2008; HOSIE et al., 2009).

A inflamação gengival crônica é uma das conseqüências 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; WATERS et al., 1993; WILLIS, 2000; HOSIE et al., 2009). Sugere-se que a disfunção imunológica determinada pelo FIV seja o principal fator responsável pelo desenvolvimento da inflamação gengival, associada ou não as alterações da microbiota local. No entanto, muitos gatos com quadros agudos de gengivite são FIV negativos, incluindo gatos com um extenso quadro de lesões crônicas na cavidade oral (HARVEY, 1991; TENORIO et al., 1991; HARVEY, 2004).

Vários estudos vêm sendo realizados para avaliar o grau de disfunção imunológica ocorrida em gatos com infecção pelo FIV por meio da citometria de fluxo,

determinando-se os valores dos linfócitos T CD4+, CD8+ e sua razão, no sangue periférico dos animais, inclusive como forma de avaliação da resposta a alguns tratamentos indicados para tal enfermidade (PEDRETTI et al., 2006; WEBB; LEHMAN; MCCORD, 2008).

Os animais infectados pelo FIV frequentemente apresentam alterações hematológicas, as quais podem surgir por ação direta ou indireta do FIV nas células circulantes, na medula óssea, doenças concorrentes ou oportunistas, ação imune mediada ou por efeito de medicamentos. Neutropenia e linfopenia são as alterações mais freqüentes, porém, nos animais em estágios mais avançados da infecção, é comum observarmos pancitopenias (anemia, linfopenia e neutropenia) devido à imunossupressão grave (HARBOUR; CANEY; SPARKES, 2004).

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, F.J. et al., 2000; OKUNSERI et al., 2003).

Num estudo realizado com 102 crianças portadoras do HIV, 69% tinham evidência de doença oral, sendo que dessas 20,6% apresentavam gengivite. Além disso, foi possível demonstrar uma maior ocorrência de gengivite em pacientes com baixas contagens de linfócitos T CD4+ (OKUNSERI et al., 2003).

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 (HARVEY, 1991; DEIHL; ROSYCHUCK, 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, autores demonstraram a alta prevalência de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD3+ no tecido gengival de pacientes humanos com gengivite crônica (ODDEN; SCHENCK; HURLEN, 1995).

A depleção da imunidade celular, portanto, poderia predispor ao desenvolvimento de inflamação gengival severa e crônica. Em estudo realizado recentemente, 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 (ERCIVAS et al., 2006).

Knowles et al. (1989) demonstraram pela primeira vez a associação entre FCV e gatos com gengivite-estomatite crônicas e infectados pelo FIV.

Em seguida, Waters et al. (1993) relataram que gatos que possuíam gengivite-estomatite crônica e infecção concomitante com FCV e FIV, apresentavam quadro clínico mais grave do que os animais que possuíam as infecções isoladas.

A hipótese do presente estudo é de que a depleção imunológica induzida pelo lentivírus felino (FIV) aumenta o risco de ocorrência do FCV e do FHV-1 e da estomatite-gengivite em gatos.

Para tanto, constituíram-se em objetivos do presente trabalho:

- Avaliar a ocorrência do calicivírus felino (FCV) e herpesvírus (FHV-1) na cavidade oral de gatos com estomatite-gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos.
- Avaliar no sangue periférico as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e da razão CD4+:CD8+ em gatos com estomatite-gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos.
- Correlacionar os diferentes graus de gengivite, segundo Waters et al. (1993) e a ocorrência do FCV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO A

O experimento A foi delineado para avaliar a ocorrência do FCV e do FHV-1 na cavidade oral de gatos naturalmente infectados pelo FIV, assim como correlacionar esses achados com as subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e da razão CD4+:CD8+.

Para tanto, foram utilizados 58 gatos adultos, sendo 18 machos e 40 fêmeas, com e sem definição racial, oriundos de colônias de gatos de diferentes locais da cidade de São Paulo, os quais foram divididos nos seguintes grupos:

GRUPO I: composto por nove gatos, sendo quatro machos e cinco fêmeas, com gengivite-estomatite crônica e naturalmente infectados pelo FIV.

GRUPO II: composto por 21 gatos, sendo seis machos e 15 fêmeas, com gengivite-estomatite crônica e não infectados pelo FIV.

GRUPO III: formado por oito gatos, sendo quatro machos e quatro fêmeas, sem gengivite-estomatite e naturalmente infectados pelo FIV

GRUPO IV: formado por 20 gatos, sendo quatro machos e 16 fêmeas, sem gengivite-estomatite e não infectados pelo FIV.

Antes de ser incluído no grupo, todo felino foi previamente testado para as infecções pelo FIV e pelo vírus da leucemia felina (FeLV), por meio da reação de nested-PCR e imunofluorescência indireta, respectivamente, sendo que todos os gatos positivos para o FeLV foram excluídos deste estudo.

3.2 EXPERIMENTO B

O experimento B foi desenvolvido para avaliar a correlação do FCV e das subpopulações de linfócitos T CD4+ com os diferentes graus de estomatite-gengivite, segundo Waters et al. (1993), em gatos naturalmente infectados pelo FIV.

Para tanto, foram utilizados 35 gatos adultos, sem definição racial, sendo 18 fêmeas e 17 machos, oriundos de colônias de gatos de diferentes locais da cidade de São Paulo, os quais foram divididos nos seguintes grupos:

GRUPO I: composto por 15 gatos naturalmente infectados pelo FIV, sendo seis fêmeas e nove machos, com diferentes graus de gengivite, segundo Waters et al. (1993).

GRUPO II: composto por 20 gatos não infectados pelo FIV, sendo 12 fêmeas e oito machos, com diferentes graus de gengivite, segundo Waters et al. (1993).

Da mesma forma que o experimento A, todos os animais foram previamente testados para as infecções pelo FIV e pelo vírus da leucemia felina (FeLV), por meio da reação de nested-PCR e imunofluorescência indireta, respectivamente, sendo que todos os gatos positivos para o FeLV foram excluídos deste estudo.

3.3 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 (JUNQUEIRA-JORGE, 2005). Esses exames foram realizados no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

3.4 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA DOS FELINOS

O material genético foi extraído das amostras de sangue, utilizando-se um kit comercial de extração¹, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

O DNA viral do FIV foi detectado por meio da técnica de PCR-Nested, sendo que para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (“primer”) FIV - A (“antisense”) 5’ TTTTCTTCTAGGGTACTTTCTGG 3’ e FIV - S (“sense”) 5’ AATATGGCTGTATCTACTGC 3’ e na nested-PCR, os “primers” FIV NESTED - A (“antisense”) 5’ CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT 3’ e FIV - S (“sense”) 5’TATTCAAACAGTAAATGGAG 3’ (HOHDATSU et al., 1998).

Como controles positivos foram utilizados 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 nucleicos até a amplificação.

3.5 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) PARA O CALICIVÍRUS (FCV) E HERPESVÍRUS TIPO-1 (FHV-1)

3.5.1 Coleta de material e conservação

A coleta de material foi realizada mediante fricção de um *swab* estéril seco nas áreas lesionadas da cavidade oral, colocados em micro tubos secos de 1,5 mL e em seguida congeladas à temperatura de -70°C até seu processamento. Foram coletadas

¹ GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit®, Amersham Biosciences

duas amostras de cada animal para avaliação, via RT-PCR e nested-PCR, quanto à presença do FCV e FHV-1 respectivamente.

3.5.2 Controles negativos e positivos

Como controle positivo para as reações de RT-PCR para o calicivírus felino e nested-PCR para o herpesvírus felino, foram utilizadas vacinas comerciais contra a calicivirose felina e a rinotraqueíte felina. Como controle negativo em cada reação, foi utilizada água ultra-pura desde a fase de extração de ácidos nucleicos até a amplificação.

3.5.3 Calicivírus felino (FCV)

3.5.3.1 Extração de RNA

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

3.5.3.2 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.

3.5.3.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação de 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 MgCl₂, 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 (Apêndice A).

3.5.4 Herpesvírus felino tipo-1 (FHV-1)

3.5.4.1 Extração de DNA

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

3.5.4.2 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 MgCl₂, 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 (anexo B).

3.6 LEUCOGRAMA

De todos os 58 felinos incluídos no estudo, foram colhidas amostras de sangue total (5mL), por venipunctura jugular ou cefálica, ficando armazenadas em tubos estéreis contendo anticoagulante (EDTA). As contagens globais de leucócitos foram executadas utilizando-se sistema automatizado (Serono® – System 9020AX). O exame diferencial dos leucócitos foi feito a partir de esfregaços de sangue preparados a fresco e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

3.7 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 felinos utilizados nos experimentos A e B, pela técnica de citometria de fluxo (BYRNE et al., 2000), a saber:

- O sangue total colhido (5mL/gato) foi armazenado em frascos contendo EDTA como anticoagulante e mantido à temperatura ambiente para processamento 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 2.6. Se o número total de leucócitos estivesse entre 5.000 e 10.000 células/mm³, fez-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 tubos¹ de 5mL.
- Adicionou-se 10μL de anticorpo monoclonal específico CD4+ (FITC)³ e CD8+ (RPE)² em cada tubo, e manteve-se incubado por 15 minutos à temperatura ambiente.
- Acrescentou-se nessas amostras 900μL de solução lise⁴ diluída em cada tubo e homogeneizou-se com *vórtex*. Essa solução promoveu lise dos eritrócitos, mantendo a integridade dos leucócitos.
- A seguir foi realizada a leitura no citômetro de fluxo⁵. Os resultados estão 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 IgG1², conjugados aos fluorocromos FITC e RPE.

² Tubos de poliestireno – Becton-Dickinson

³ Serotec – www.serotec.co.uk

⁴ Solução de lise, “Facslysing Solution”- Becton-Dickinson

⁵ Becton-Dickinson FACScan

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.1 EXPERIMENTO A

A análise dos dados constou inicialmente da avaliação da associação entre as viroses entre si e com a ocorrência de gengivite. Para tanto, foram construídas tabelas de frequências absolutas e porcentagens e utilizou-se os testes Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fischer (FLEISS, 1981; ROSNER, 1986). Para avaliar a influência conjunta das viroses na ocorrência de gengivite utilizou-se a metodologia de regressão logística (HOSMER JR.; LEMESHOW, 1976).

Para cada combinação dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite as variáveis CD4+, CD8+, 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, falta de normalidade e heterocedasticidade, 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 FIV, FCV, FHV1 e gengivite em cada uma dessas variáveis.

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

4.2 EXPERIMENTO B

A análise dos dados constou inicialmente da avaliação da associação entre a presença de FIV, FCV, gengivite e grau de gengivite. Para tanto, foram construídas

tabelas de frequências absolutas e porcentagens e utilizou-se os testes Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher (FLEISS, 1981; ROSNER, 1986).

A variável CD4+ foi resumida por meio das medidas: mínimo e máximo, mediana, 1º quartil (Q1), 3º quartil (Q3), média e erro-padrão e gráficos de média com intervalos de 95% de confiança e *Box-plots*. Como a suposição de normalidade não foi violada, utilizou-se a análise de variância para avaliar a influência conjunta dos fatores FIV, FCV e gengivite no CD4+ (NETER et al., 1996).

O nível de significância estabelecido para análise foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO A

Foram realizados 116 exames de PCR sendo 58 RT-PCR para o FCV e 58 nested-PCR para o FHV-1, onde todos os animais incluídos no projeto foram testados para ambos os vírus, obtendo-se resultados positivos ou negativos para cada um.

Inicialmente, realizou-se a avaliação da associação entre o FIV, FCV e FHV-1 e foi observado que há maior presença de infecção pelo FHV-1 em animais infectados pelo FIV ($p < 0,05$). Também entre os animais FIV positivos existe uma maior proporção de infectados pelo FCV, quando comparados aos animais não infectados pelo FIV mas essa associação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das frequências das variáveis FCV, FHV1 segundo infecção ou não pelo FIV - São Paulo - 2010

FIV							
Virose	Categoria	Negativo		Positivo		Total	p (nível descritivo)
		N	%	N	%		
FCV	Negativo	31	75,6	9	52,9	40	0,089 ⁽¹⁾
	Positivo	10	24,4	8	47,1	18	
	Total	41	100,0	17	100,0	58	
FHV1	Negativo	40	97,6	13	76,5	53	0,023 ⁽²⁾
	Positivo	1	2,4	4	23,5	5	
	Total	41	100,0	17	100,0	58	

1: Qui-quadrado

2: Teste exato de Fisher

Pela análise da relação dos três agentes virais estudados (FIV, FCV e FHV-1), pôde-se observar que somente o FCV está relacionado à gengivite. Entre os animais

positivos para o FCV, 88,9% apresentaram gengivite enquanto que entre os animais negativos para o FCV apenas 35% apresentaram gengivite (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das frequências da gengivite segundo a infecção pelo FIV, FCV e FHV1 - São Paulo - 2010

FIV, FCV e FHV1 - São Paulo - 2018								
Virose	Categoria	Gengivite				Total		p (nível descritivo)
		Negativo		Positivo				
		N	%	N	%	N	%	
FIV	Negativo	20	48,8	21	51,2	41	100%	0,905 ⁽¹⁾
	Positivo	8	47,1	9	52,9	17	100%	
FCV	Negativo	26	65,0	14	35,0	40	100%	<0,001 ⁽¹⁾
	Positivo	2	11,1	16	88,9	18	100%	
FHV1	Negativo	27	50,9	26	49,1	53	100%	0,354 ⁽²⁾
	Positivo	1	20,0	4	80,0	5	100%	

1: Qui-quadrado

2: Teste exato de Fisher

Pelo modelo estatístico aplicado, pôde-se confirmar que o FCV é o único vírus que está associado à ocorrência da gengivite e que nenhuma interação entre os agentes virais potencializa a chance de desenvolvimento da gengivite (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da regressão logística que avalia a relação dos fatores conjuntamente com a gengivite, assim como as interações entre eles - São Paulo - 2010

Efeito	p (nível descritivo)
Interação FIV × FCV	0,884
Interação FIV × FHV1	0,955
Interação FCV × FHV1	0,949
Efeito principal de FIV	0,540
Efeito principal de FCV	0,014
Efeito principal de FHV1	0,965

Determinou-se também que a chance de desenvolvimento da gengivite (“odds ratio”) para os animais FCV positivos é 14,857 maior do que para os FCV negativos.

As medidas descritivas dos valores dos linfócitos T CD4+ nos diferentes grupos encontram-se na tabela 4 e ilustradas no gráfico 1.

Tabela 4 - Medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite - São Paulo - 2010

FIV	FCV	FHV1	Gengivite	N	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	19	298,53	819,68	1.291,26	1.929,31	5.510,75	1.621,67	285,66
			Positivo	11	146,66	457,91	1.575,94	2.906,81	4.745,48	1.910,06	426,30
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	1	1.271,00	1.271,00	1.271,00	1.271,00	1.271,00	1.271,00	—
	Positivo	Negativo	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
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	6	186,62	655,66	1.335,74	1.740,13	2.401,18	1.275,84	325,10
			Positivo	2	560,00	560,00	960,00	1.360,00	1.360,00	960,00	400,00
		Positivo	Negativo	1	225,94	225,94	225,94	225,94	225,94	225,94	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
	Positivo	Negativo	Negativo	1	2.108,00	2.108,00	2.108,00	2.108,00	2.108,00	2.108,00	—
			Positivo	4	128,00	350,50	700,00	1.640,00	2.453,00	995,25	506,93
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	3	377,00	377,00	871,00	1.011,00	1.011,00	753,00	192,29

Gráfico 1 - Diagrama de caixa dos valores de linfócitos T CD4+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite - São Paulo - 2010

Pela análise de variância foi possível concluir que nenhum dos fatores (FIV, FCV, FHV-1 e gengivite) interferiu na relação de qualquer outro fator com os valores de CD4+. Adicionalmente, nenhum dos fatores isoladamente alterou significativamente os valores dos linfócitos T CD4+.

As medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD8+ nos diferentes grupos encontram-se na tabela 5 e ilustradas no gráfico 2.

Tabela 5 - Medidas descritivas dos valores de linfócitos CD8+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite - São Paulo - 2010

FIV	FCV	FHV1	Gengivite	N	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	19	239,04	332,51	556,18	1.153,15	3.321,86	827,66	172,37
			Positivo	11	115,24	384,80	671,23	767,04	3.198,04	889,09	264,99
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	1	814,88	814,88	814,88	814,88	814,88	814,88	—
	Positivo	Negativo	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
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	6	331,76	829,89	1.127,08	2.527,56	3.038,78	1.497,02	429,16
			Positivo	2	796,00	796,00	1.116,50	1.437,00	1.437,00	1.116,50	320,50
		Positivo	Negativo	1	227,99	227,99	227,99	227,99	227,99	227,99	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
	Positivo	Negativo	Negativo	1	6.239,68	6.239,68	6.239,68	6.239,68	6.239,68	6.239,68	—
			Positivo	4	347,00	671,00	1.565,00	2.269,50	2.404,00	1.470,25	483,16
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	3	679,00	679,00	748,00	785,00	785,00	737,33	31,06

Gráfico 2 - Diagrama de caixa dos valores de linfócitos T CD8+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite - São Paulo - 2010

Analogamente aos valores de CD4+, a análise de variância indicou que nenhum dos fatores interferiu na relação de qualquer outro fator com os níveis de linfócitos T CD8+ porém a presença da infecção pelo FIV acarretou em aumento significativo nos valores de CD8+ ($p=0,004$).

As medidas descritivas dos valores da razão CD4:CD8 nos diferentes grupos encontram-se na tabela 6 e ilustradas no gráfico 3.

Tabela 6 - Medidas descritivas da razão CD4:CD8 segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite - São Paulo - 2010

FIV	FCV	FHV1	Gengivite	N	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	19	0,77	1,67	2,06	3,08	3,73	2,20	0,18
			Positivo	11	1,19	1,48	2,18	2,93	3,87	2,27	0,27
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	1	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	—
	Positivo	Negativo	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
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	6	0,56	0,62	0,79	0,91	1,64	0,89	0,16
			Positivo	2	0,70	0,70	0,82	0,94	0,94	0,82	0,12
		Positivo	Negativo	1	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
	Positivo	Negativo	Negativo	1	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	—
			Positivo	4	0,36	0,37	0,48	0,80	1,02	0,58	0,15
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	3	0,55	0,55	1,13	1,28	1,28	0,99	0,22

Gráfico 3 - Diagrama de caixas dos valores da razão dos linfócitos T CD4:CD8+ para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite - São Paulo - 2010

Também foi demonstrado que nenhum dos fatores interferiu na relação de qualquer outro fator com a razão CD4:CD8 mas a presença de FIV provoca uma diminuição significativa na CD4:CD8 ($p < 0,001$), assim como a infecção pelo FCV ($p = 0,032$).

As medidas descritivas dos valores dos linfócitos totais nos diferentes grupos encontram-se na tabela 7 e ilustradas no gráfico 4.

Tabela 7 - Medidas descritivas da relação de linfócitos totais segundo as combinações dos fatores FIV, FCV, FHV1 e gengivite - São Paulo - 2010

FIV	FCV	FHV1	Gengivite	N	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	19	1.853,00	3.328,00	4.389,00	7.104,00	12.750,00	5.487,32	705,99
			Positivo	11	2.619,00	4.056,00	5.640,00	7.359,00	13.755,00	6.293,27	956,46
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	1	5.125,00	5.125,00	5.125,00	5.125,00	5.125,00	5.125,00	—
	Positivo	Negativo	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	1.296,52
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	6	1.595,00	4.585,00	6.094,50	9.614,00	13.566,00	6.924,83	1.720,31
			Positivo	2	4.823,00	4.823,00	5.356,50	5.890,00	5.890,00	5.356,50	533,50
		Positivo	Negativo	1	2.054,00	2.054,00	2.054,00	2.054,00	2.054,00	2.054,00	—
			Positivo	0	—	—	—	—	—	—	—
	Positivo	Negativo	Negativo	1	16.864,00	16.864,00	16.864,00	16.864,00	16.864,00	16.864,00	—
			Positivo	4	1.334,00	2.979,50	6.252,50	10.012,00	12.144,00	6.495,75	2.308,72
		Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
			Positivo	3	3.523,00	3.523,00	3.772,00	4.400,00	4.400,00	3.898,33	260,93

Gráfico 4 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos totais para as combinações de FIV, FCV, FHV-1 e gengivite - São Paulo - 2010

A análise de variância demonstrou que os linfócitos totais não se alteram na presença de qualquer fator ou qualquer combinação entre eles.

5.2 EXPERIMENTO B

Foram realizados 70 exames de PCR para diagnóstico, sendo 35 RT-PCR para o FCV e 35 nested-PCR para o FHV, onde todos os animais incluídos no estudo foram testados para ambos os vírus, obtendo-se resultados positivos ou negativos para cada um.

Avaliando-se os valores descritivos apresentados na tabela 8, identificou-se que a infecção pelo FIV está associada à ocorrência da infecção pelo FCV ($p=0,011$), à presença de gengivite ($p=0,022$) e ao grau de gengivite ($p<0,001$), sendo que os gatos infectados pelo FIV foram os que apresentaram graus mais graves de gengivite.

Portanto, no grupo dos animais infectados pelo FIV pôde-se observar maior ocorrência do FCV e presença de gengivite.

Tabela 8 - Distribuição das frequências das variáveis FCV, gengivite, grau de gengivite e sexo segundo a infecção ou não pelo FIV - São Paulo - 2010

		FIV					
Variável	Categoria	Negativo		Positivo		Total	p (nível descritivo)
		N	%	N	%	N	
FCV	Negativo	19	95,0	8	53,3	27	0,011 ⁽²⁾
	Positivo	1	5,0	7	46,7	8	
	Total	20	100,0	15	100,0	35	
Gengivite	Negativo	9	45,0	1	6,7	10	0,022 ⁽²⁾
	Positivo	11	55,0	14	93,3	25	
	Total	20	100,0	15	100,0	35	
Grau de	0	9	45,0	1	6,7	10	<0,001 ⁽²⁾
Gengivite	1	9	45,0	2	13,3	11	
	2	2	10,0	5	33,3	7	
	3	0	0	4	26,7	4	
	4	0	0	3	20,0	3	
	Total	20	100,0	15	100,0	35	
Sexo	Feminino	12	60,0	6	40,0	18	0,241 ⁽¹⁾
	Maculino	8	40,0	9	60,0	17	
	Total	20	100,0	15	100,0	35	

1: Qui-quadrado

2: Teste exato de Fisher

Em seguida, realizou-se uma avaliação entre a infecção pelo FCV e a presença da gengivite e seus diferentes graus e determinou-se que a relação entre a ocorrência do FCV e a presença de gengivite, embora não tenha apresentado significância estatística

($p=0,073$), há uma maior tendência dos gatos infectados pelo FCV apresentarem maior frequência de gengivite. Já o grau de gengivite está diretamente associado à infecção pelo FCV ($p<0,001$), onde os animais positivos para este vírus apresentaram graus mais graves de gengivite (Tabela 9) (Apêndices C, D, E, F e G).

Tabela 9 - Distribuição das frequências das variáveis gengivite, grau de gengivite e sexo segundo a infecção ou não pelo FCV - São Paulo - 2010

		FCV					
Variável	Categoria	Negativo		Positivo		Total	P (nível descritivo)
		N	%	N	%		
Gengivite	Negativo	10	37,0	0	0,0	10	0,073 ⁽²⁾
	Positivo	17	63,0	8	100,0	25	
	Total	27	100,0	8	100,0	35	
Grau de Gengivite	0	10	37,0	0	0	10	<0,001 ⁽²⁾
1	8	29,6	3	37,5	11		
2	7	25,9	0	0	7		
3	2	7,4	2	25,0	4		
4	0	0	3	37,5	3		
Total	27	100,0	8	100,0	35		
Sexo	Feminino	13	48,1	5	62,5	18	0,691 ⁽²⁾
	Maculino	14	51,9	3	37,5	17	
	Total	27	100,0	8	100,0	35	

1: Qui-quadrado

2: Teste exato de Fisher

Com relação ao sexo, pelas tabelas 8, 9 e 10, observou-se que não houve associação com nenhuma das variáveis.

Tabela 10 - Distribuição das frequências da variável sexo segundo a presença ou não de gengivite - São Paulo - 2010

Saúde do gengivite - São Paulo - 2016							
Variável	Categoria	Gengivite				Total	p (nível descritivo)
		Negativo		Positivo			
		N	%	N	%		
Sexo	Feminino	5	50,0	13	52,0	18	0,915 ⁽¹⁾
	Masculino	5	50,0	12	48,0	17	
	Total	10	100,0	25	100,0	35	

1: Qui-quadrado

2: Teste exato de Fisher

Na tabela 11 estão apresentadas as medidas descritivas dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores FVI, FCV e gengivite e também estão ilustradas no gráfico 5.

Tabela 11 - Medidas descritivas dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo as combinações dos fatores FIV, FCV e gengivite - São Paulo - 2010

FIV	FCV	Gengivite	N	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
Negativo	Negativo	Negativo	9	232,40	644,60	932,70	1074,32	1741,2	961,81	164,73
		Positivo	10	485,76	727,40	1180,73	1509,82	1831,00	1117,89	144,02
	Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
		Positivo	1	987,94	987,94	987,94	987,94	987,94	987,94	—
Positivo	Negativo	Negativo	1	259,03	259,03	259,03	259,03	259,03	259,03	—
		Positivo	7	93,10	154,30	290,90	600,64	684,40	355,28	87,90
	Positivo	Negativo	0	—	—	—	—	—	—	—
		Positivo	7	140,30	197,10	314,96	865,92	1040,69	473,35	131,89

Gráfico 5 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ para as combinações de FIV, FCV e gengivite - São Paulo - 2010

Avaliando-se estes resultados pôde-se demonstrar que os gatos que apresentavam combinações de fatores incluindo a infecção pelo FIV apresentaram contagens de linfócitos T CD4+ mais baixas do que as combinações que não apresentavam esse fator.

A partir disso, foram realizadas análises para cada fator separadamente que estão apresentadas na tabela 12 e ilustradas nos gráficos 6, 7, 8 e 9.

Tabela 12 - Medidas descritivas dos valores de linfócitos T CD4+ segundo cada fator separadamente - São Paulo - 2010

Variável	Categoria	n	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	Média	Erro-padrão
FIV	Negativo	20	232,40	686,00	1015,87	1372,56	1831,00	1041,16	101,81
	Positivo	15	93,10	187,60	290,90	600,64	1040,69	403,96	73,24
FCV	Negativo	27	93,10	476,00	727,40	1196,84	1831,00	836,34	100,09
	Positivo	8	140,30	232,60	400,66	926,93	1040,69	537,67	131,09
Gengivite	Negativo	10	232,40	477,62	904,30	1074,32	1741,20	891,54	163,24
	Positivo	25	93,10	290,90	632,94	1040,69	1831,00	718,69	99,45
Grau de	0	10	232,40	477,62	904,30	1074,32	1741,20	891,54	163,24
Gengivite	1	11	197,10	485,76	987,94	1509,82	1831,00	986,28	163,60
	2	7	154,30	187,60	600,64	684,40	1196,84	561,82	132,59
	3	4	93,10	116,70	215,60	578,41	865,92	347,56	177,86
	4	3	268,10	268,10	486,36	1040,69	1040,69	598,38	229,95

Gráfico 6 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo a infecção ou não pelo FIV - São Paulo - 2010

Gráfico 7 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo infecção ou não pelo FCV - São Paulo - 2010

Gráfico 8 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo presença ou não de gengivite - São Paulo - 2010

Gráfico 9 - Diagrama de caixa dos valores dos linfócitos T CD4+ segundo os diferentes graus de gengivite - São Paulo - 2010

Avaliando-se os fatores separadamente, observou-se que os animais infectados pelo FIV e os que apresentavam maiores graus de gengivite foram os que apresentaram contagens inferiores de linfócitos T CD4+

Pela análise de variância, pôde-se determinar que as diferenças entre os valores dos linfócitos T CD4+ médios entre os animais infectados e não infectados pelo FCV e com presença ou não de gengivite, não foi potencializada pela infecção pelo FIV ($p=0,611$ e $p=0,901$, respectivamente) e analisando-se os efeitos principais, somente a infecção pelo FIV provoca uma diminuição significativa nos valores dos linfócitos T CD4+ ($p=0,016$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados obtidos a partir da análise de variância para os valores de linfócitos T CD4+ com os fatores FIV, FCV e gengivite - São Paulo - 2010

Efeito	p (nível descritivo)
Interação FIV × FCV	0,611
Interação FIV × Gengivite	0,901
Efeito principal de FIV	0,016
Efeito principal de FCV	0,980
Efeito principal de Gengivite	0,601

6 DISCUSSÃO

O vírus da imunodeficiência felina, o calicivírus felino e o herpesvírus felino tipo 1 são agentes infecciosos causadores de infecções crônicas, além de uma provável participação na gênese da gengivite-estomatite crônica dos felinos (KNOWLES et al., 1989; TENORIO et al., 1991; WATERS et al., 1993; BENDINELLI et al., 1995; HARGIS; GINN, 1999; ADDIE et al., 2003; LOMMER; VERSTRAETE, 2003; DOWERS et al., 2009).

No experimento A do presente estudo, observou-se uma significativa ocorrência do FCV nos grupos I e II que foram compostos por animais com gengivite crônica, denotando boa correlação entre a presença da gengivite e a ocorrência do FCV, o que corrobora com resultados de trabalhos anteriores. Além disso, no experimento B também se determinou significativa ocorrência do FCV nos gatos com gengivite crônica de graus mais elevados (KNOWLES et al., 1989; HARBOUR; HOWARD; GASKELL, 1991; WATERS et al., 1993; ADDIE et al., 2003; LOMMER; VERSTRAETE, 2003; DOWERS et al., 2009; ZICOLA et al., 2009).

Outros autores não conseguiram demonstrar associação entre a infecção pelo FCV e a gengivite crônica, mas citam maior possibilidade de desenvolvimento da doença em gatos infectados pelo FIV (KNOWLES et al., 1991; TENORIO et al., 1991; QUIMBY et al., 2008).

A gengivite crônica é uma manifestação comum entre os gatos infectados pelo FIV, sugerindo-se que a grave disfunção imunológica determinada pelo FIV seja o principal fator responsável pelo desenvolvimento da inflamação gengival, associada ou não as alterações da microbiota local (KNOWLES et al., 1989; TENORIO et al., 1991; WATERS et al., 1993). Estas alterações correspondem a um declínio progressivo dos níveis de linfócitos T CD4+, a uma inversão na razão de linfócitos T CD4+:CD8+ e a uma depressão na blastogênese dos linfócitos (TENORIO et al., 1991). No presente estudo, pôde-se demonstrar que os gatos infectados pelo FIV apresentaram depleção dos linfócitos T CD4+, aumento dos linfócitos T CD8+ e, portanto, inversão na razão

CD4+:CD8+, porém apenas no experimento 2 houve correlação significativa entre a infecção pelo FIV, ocorrência do FCV e presença de gengivite.

No trabalho de Waters et al. (1993), verificou-se que a cepa do FCV isolada foi capaz de induzir a gengivite crônica mesmo naqueles animais sem a infecção pelo FIV. Além disso, o mesmo autor também cita que os longos períodos em que os gatos ficam como portadores do FCV favorecem o desenvolvimento da gengivite crônica.

Apesar das doenças orais serem muito frequentes em animais infectados pelo FIV, um grande número de gatos apresenta CGEF mesmo sem a infecção por este vírus. Este fato indica que é muito provável que outros fatores ou agentes virais influenciem no desenvolvimento da gengivite crônica (HARVEY, 1991).

No experimento A, os grupos que eram compostos por animais com CGEF, apresentaram ocorrência significativa de infecção pelo FCV e no experimento B, pôde ser observado que os gatos que apresentavam maior grau de gengivite, apresentavam também maior depleção de linfócitos T CD4+ e ocorrência significativa do FCV, em semelhança aos resultados demonstrados em estudos anteriores (WATERS et al., 1993; ADDIE et al., 2003; LOMMER; VERSTRAETE, 2003; DOWERS et al., 2009; ZICOLA et al., 2009).

Estudos sobre diferenças genéticas e de perfil antigênico dos FCV têm sido publicados mostrando que as cepas isoladas de animais que apresentavam gengivite crônica eram antigenicamente distintas das isoladas em animais com sintomas de infecção respiratória aguda. Uma das explicações para esse fato seria que essas variações antigênicas surgiriam em resposta à atuação do sistema imunológico do hospedeiro, para que se estabeleça uma infecção persistente. A cronicidade da infecção levaria à emergência de isolados com perfis antigênicos diferentes dos outros (POULET et al., 2000; RADFORD et al., 2007; PESAVENTO; CHANG; PARKER, 2008).

Essas diferenças antigênicas entre as cepas do FCV geradas nas infecções crônicas são causadas por mutações genéticas induzidas pela resposta imune de cada hospedeiro, particularmente em regiões imunogênicas hipervariáveis do capsídeo protéico (POULET et al., 2000; GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; PESAVENTO; CHANG; PARKER, 2008).

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 epidêmicos em diversos países de uma doença sistêmica grave causada por uma cepa virulenta de calicivírus (VS-FCV), levando a alta mortalidade nos animais infectados. Clinicamente estes animais apresentavam febre, anorexia, dispnéia, ulceração em cavidade oral, edema facial e em membros, icterícia, pancreatite e, em alguns casos, distúrbios hemorrágicos. Essas cepas virulentas eram diferentes antigenicamente nos diferentes surtos e também distintas das cepas causadoras de doença respiratória e oral, portanto diferiam em patogenicidade e receberam nomes específicos em cada surto (PEDERSEN et al., 2000; SCHORR-EVANS et al., 2003; HURLEY et al., 2004; OSSIBOFF et al., 2007; REYNOLDS et al., 2009).

A genética viral e a variabilidade antigênica do FCV permitem-no escapar dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro e também explica seu tropismo por diversos tecidos e a virulência extremamente variável que possui nas diversas apresentações clínicas da infecção (REYNOLDS et al., 2009).

Vários trabalhos comprovam a eficácia do exame de RT-PCR para detecção do FCV em *swabs* de mucosas nasal, conjuntival e orofaringe, apresentando alta sensibilidade e especificidade, sendo que sua sensibilidade é superior a do isolamento viral e do ELISA (CAI et al., 2002; QUIMBY et al., 2008; DOWERS et al., 2009; RADFORD et al., 2009; ZICOLA et al., 2009). Além disso, RT-PCR permite a identificação da cepa viral, estudos em epidemiologia molecular e investigação em surtos epidêmicos (PEDERSEN et al., 2000; SCHORR-EVANS et al., 2003; HURLEY et al., 2004; OSSIBOFF et al., 2007; REYNOLDS et al., 2009).

Com relação ao FHV-1, alguns autores conseguiram obter associação entre a sua ocorrência e a presença da gengivite crônica (HARGIS; GINN, 1999; LOMMER; VERSTRAETE, 2003), porém no presente estudo não foi possível demonstrar esta correlação nos animais dos grupos I e II do experimento A, devido à baixa detecção do vírus.

No estudo realizado por Lommer; Verstraete (2003), foi demonstrado que em 88% dos gatos estudados que apresentavam CGEF, foram isolados o FCV e o FHV-1

concomitantemente. Os autores acreditaram que as infecções pelo FCV e FHV-1, combinadas com a placa bacteriana, estimularam o aumento de infiltrado linfocítico na mucosa oral. De qualquer modo, a relação causal não pôde ser demonstrada.

Os primeiros estudos também falharam ao tentar demonstrar esta associação. Nestes trabalhos foram utilizadas técnicas de isolamento viral a partir de *swabs* colhidos da cavidade oral dos animais com gengivite crônica, porém a ocorrência do FHV-1 foi muito baixa (KNOWLES et al., 1989; HARBOUR; HOWARD; GASKELL, 1991; WATERS et al., 1993; GASKELL et al., 2007).

Em sequência novos estudos foram realizados visando à detecção do FHV-1 em gatos com gengivite crônica por meio da PCR, utilizando-se *swabs* e amostras de biópsia de cavidade oral. Nestes relatos também não foi demonstrada correlação entre a presença da gengivite e a ocorrência do FHV-1, o que avigora os resultados obtidos nesta pesquisa (QUIMBY et al., 2008; DOWERS et al., 2009).

Diferenças significativas foram obtidas quando associamos as infecções pelo FIV e o FHV-1, ou seja, existe maior ocorrência de FHV-1 nos animais com a infecção pelo FIV, independentemente da presença de gengivite.

Esses resultados podem ser interpretados analisando-se o comportamento biológico do FIV e do FHV-1, e suas inter-relações com o hospedeiro e ambiente.

Após a infecção, o FHV-1 realiza replicação na fase aguda da doença predominantemente em mucosas do septo nasal, ossos turbinados, nasofaringe e tonsilas. A eliminação viral pode ser detectada após 24 horas da infecção e geralmente persiste por uma a três semanas. A infecção do epitélio respiratório induz áreas de necrose epitelial multifocal com infiltração neutrofílica e exsudação com presença de fibrina (GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007).

Os animais uma vez infectados apresentam manifestações clínicas agudas da doença e eliminam o vírus em grandes quantidades nas secreções nasais, oculares e orais por até três semanas. Após isso, o animal torna-se clinicamente normal, aparentemente sem eliminação viral. Nesta fase o animal passa a apresentar infecção latente em gânglio trigêmio, podendo sofrer recrudescência dos sintomas mediante fatores de estresse e/ou administração de glicocorticóides, voltando a eliminar

ativamente cargas virais variáveis (GASKELL; DAWSON; RADFORD, 2006; GASKELL et al., 2007).

Animais infectados pelo FIV apresentam sintomas mais graves da infecção pelo FHV-1, persistem doentes por períodos mais longos e eliminam cargas virais maiores nas secreções. Além disso, estes animais tornam-se mais susceptíveis a alterações crônicas decorrentes da infecção pelo FHV-1 e apresentam episódios de recidivas com maior frequência (REUBEL et al., 1992).

Os gatos infectados pelo FIV, em determinadas fases da doença apresentam imunossupressão importante, com declínio intenso do número de linfócitos T CD4+, o que faz com que haja maior susceptibilidade a infecções oportunistas por bactérias, fungos e vírus, particularmente aqueles que afetam o sistema respiratório superior, cavidade oral e conjuntiva (DUNHAM; GRAHAM, 2008).

Os animais deste estudo pertenciam a colônias de gatos e viviam em ambientes aglomerados, portanto, esses resultados podem ser parcialmente explicados por uma infecção crônica pelo FHV-1 induzida por algum fator de estresse ou pela infecção pelo FIV, que mantém esses gatos eliminando FHV-1 por longos períodos e que, na ocasião, não era suficiente para induzir a manifestações dos sintomas. Embora a PCR não possa responder essas questões, esses resultados indicam que o FHV-1 está presente na cavidade oral de gatos infectados pelo FIV, mesmo sem a manifestação clínica de gengivite crônica, talvez porque esse agente não tenha uma efetiva participação no desenvolvimento da gengivite crônica.

Muitos autores têm comprovado a alta sensibilidade da técnica de nested-PCR para a detecção do FHV-1 em *swabs* de mucosas nasal, conjuntival, e orofaríngea e outros tipos de amostras, como fragmentos de biópsia e córneas, extraídos de animais com e sem sintomas de doença respiratória e ocular agudas. Todos esses autores utilizaram *primers* direcionados ao gene da timidina-quinase para amplificação do segmento de DNA alvo (HARA et al., 1996; STILES et al., 1997a; WEIGLER et al., 1997; MARSILIO, F; et al., 2004; STILES; POGRANICHNIY, 2008).

No trabalho realizado por Weigler et al (1997), é descrita a eficácia do exame da PCR no diagnóstico das infecções respiratórias agudas pelo FHV-1, utilizando-se *swabs*

conjuntivais e orofaríngeos e das infecções latentes, utilizando-se amostras de gânglio trigêmio, nervo óptico, quiasma óptico e bulbo olfatório.

A sensibilidade superior da nested-PCR para detecção do FHV-1 a partir de amostras de *swabs* conjuntivais e orofaríngeos, em comparação às técnicas de isolamento viral e imunofluorescência, foi determinada em estudos comparativos, principalmente em casos de eliminação de baixas cargas virais (STILES et al., 1997b; BURGESSER et al., 1999).

Com base nos parágrafos anteriores e observando a baixa positividade para o FHV-1 no grupo I do experimento A, pode-se interpretar esses resultados de duas maneiras: verdadeira ausência do vírus na cavidade oral desses animais ou alterações relacionadas desde a coleta das amostras até seu processamento na extração de DNA e nested-PCR.

Devido à citólise epitelial e infiltrado inflamatório causado pelo FHV-1, supôs-se que maior quantidade de material celular pudesse ser coletada pelos *swabs* nos gatos que apresentassem graus mais avançados de lesões, favorecendo a reação da PCR, porém aumento importante na concentração de DNA extraído numa amostra reduz a chance de detecção pela PCR, pois leva à depleção dos *primers* nas primeiras amplificações, assim como baixas concentrações de DNA alvo na amostra também reduzem a sensibilidade do exame. Além disso, não há correlação entre a gravidade das lesões e a quantidade de DNA alvo, pois há variação conforme o grau de lesão epitelial e a atividade viral nos diferentes estágios da doença (WESTERMEYER; KADO-FONG; MAGGS, 2008).

Neste estudo, não será possível afirmar o que realmente determinou esses resultados, porém todas as medidas necessárias para padronização da técnica da PCR, desde a coleta do material, conservação das amostras, extração do DNA e execução da nested-PCR, foram tomadas para que não houvesse interferência do método nos resultados finais.

Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, os valores absolutos e médios das contagens de linfócitos T CD4⁺ foram menores nos animais infectados pelo FIV em comparação aos não infectados, independentemente da presença ou não da gengivite, em concordância com os trabalhos anteriormente

publicados (VAHLENKAMP; TOMPKINS; TOMPKINS, 2004; PEDRETTI et al., 2006; DUNHAM; GRAHAM, 2008; ELDER et al., 2008; HOSIE et al., 2009). Além disso, os gatos que apresentavam infecção pelos três vírus foram os que apresentaram contagens mais baixas, fato que pode ser explicado pela imunossupressão grave que poderia estar acometendo esses indivíduos.

Em crianças portadoras do HIV foi demonstrado também associação entre a presença de gengivite e baixo percentual de linfócitos T CD4+ e que quanto mais baixo o valor de CD4+ mais graves as lesões orais, porém, no experimento A do presente estudo esta associação não pôde ser observada, já que os valores de linfócitos T CD4+ não se alteraram significativamente na presença ou ausência da gengivite (OKUNSERI et al., 2003).

Em contrapartida, no experimento B, apesar de não haver diferença significativa dos valores médios de células CD4+ nos gatos com e sem gengivite, quando avaliamos as contagens de CD4+ nos diferentes graus de gengivite, observa-se que as contagens de células CD4+ são sensivelmente mais baixas nos animais com graus mais elevados de gengivite.

Estudos com seres humanos infectados pelo HIV divergem sobre a relação entre a gravidade das lesões na cavidade oral e a depleção dos linfócitos T CD4+. Alguns autores demonstraram que quanto mais intensa era a depleção dos linfócitos T CD4+, mais graves eram as lesões gengivais, sendo também um fator de prognóstico para a infecção pelo HIV (HOWELL et al., 1996; RAMOS-GOMEZ, F. J. et al., 2000; SANTOS et al., 2001). Porém, outros pesquisadores mostraram que não há correlação entre a gravidade das lesões orais e os valores dos linfócitos T CD4+ (GRANDO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2005; LEMOS; OLIVEIRA; VENCIO, 2010).

Outras manifestações de doença oral também foram associadas à grave imunossupressão causada pelo HIV. A presença de candidíase oral foi diretamente relacionada as contagens baixas de linfócitos T CD4+, podendo ser usada como indicador de progressão da doença (RAMOS-GOMEZ, F. J. et al., 2000; KERDPON et al., 2004).

Com relação às células CD8+, felinos infectados pelo FIV apresentaram aumento do número dessas células, independente da presença ou não da gengivite,

corroborando os resultados de outros autores (HARBOUR; CANEY; SPARKES, 2004; PEDRETTI et al., 2006).

Esse último dado é o principal responsável pela redução significativa na razão entre CD4+:CD8+, encontrada nos animais infectados pelo FIV, que também foi detectado em trabalhos anteriores (HARBOUR; CANEY; SPARKES, 2004; PEDRETTI et al., 2006; WEBB; LEHMAN; MCCORD, 2008; RECHE JR et al., 2010).

Pôde ser observado que os gatos que apresentavam infecção concomitante pelo FIV e FCV e que também apresentavam gengivite, foram os que apresentaram valor médio de linfócitos T CD8+ mais elevado e também menores valores da razão CD4+:CD8+. Esse resultado mostra que, quanto maior a imunossupressão causada pelo FIV, mais susceptível fica o indivíduo para outros agentes infecciosos e, neste caso, a infecção pelo FCV aumenta a chance de desenvolvimento da gengivite crônica.

Devido à imunossupressão induzida pelo FIV, muitas alterações hematológicas foram descritas nos animais infectados causadas por ação viral direta ou indireta nas células circulantes no sangue periférico e na medula óssea, mecanismos imune mediados e por infecções oportunistas. Uma das alterações mais frequentes em gatos FIV positivos é a linfopenia (HARBOUR; CANEY; SPARKES, 2004).

No presente estudo, não houve diferenças significativas no número de linfócitos totais entre os animais FIV positivos e negativos. A presença da infecção pelo FCV e FHV-1 também não alterou significativamente as contagens de linfócitos.

Em um estudo comparando as alterações hematológicas em felinos com infecção pelo FIV e FeLV, foi demonstrado que os animais FIV positivos apresentavam poucas alterações hematológicas quando comparadas ao FeLV, e também não apontou alterações quanto aos linfócitos totais nos gatos FIV positivos (GLEICH; HARTMANN, 2009).

7 CONCLUSÕES

Pelo presente estudo, pôde-se concluir que a ocorrência da infecção pelo FCV está diretamente associada ao CGEF em felinos, independentemente da presença da infecção pelo FIV. Vale ressaltar que, a ocorrência do FCV foi significativa em animais que apresentavam graus mais graves de gengivite.

Também podemos concluir que os gatos infectados pelo FIV apresentam depleção significativa dos linfócitos T CD4+, aumento dos números de linfócitos T CD8+ e diminuição da razão entre células CD4+:CD8+, evidenciando uma disfunção imunológica nesses animais. Além disso, os gatos que apresentavam graus mais graves de gengivite, foram os que apresentaram menores valores de linfócitos T CD4+ e maior ocorrência de infecção pelo FCV.

Contudo, não é possível saber se a co-infecção pelo FIV e FCV foi responsável pelo agravamento da gengivite e da condição imunológica dos gatos ou se a disfunção do sistema imune causada pelo FIV predispôs a infecção pelo FCV, levando a piora das lesões orais.

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, n. 4, p. 172-176, 2003.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVADI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: as interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 87-112, 1995.
- BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, **Anais...**São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 50.
- BURGESSER, K. M.; HOTALING, S.; SCHIEBEL, A.; ASHBAUGH, S. E.; ROBERTS, S. M.; COLLINS, J. K. Comparison of PCR, virus isolation, and indirect fluorescent antibody staining in the detection of naturally occurring feline herpesvirus infections. **J Vet Diagn Invest**, v. 11, p. 122-126, 1999.
- 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.
- CAI, Y.; FUKUSHI, H.; KOYASU, S.; KURODA, E.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 3, p. 215-219, 2002.
- 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 and STDs**, v. 14, n. 12, p. 627-635, 2000.
- CHOMKINSKY, 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. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 23, n. 1, p. 139-153, 1993.

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, 2010.

DUNHAM, S. P.; GRAHAM, E. Retroviral infections of small animals **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, p. 879-901, 2008.

ELDER, J. H.; SUNDSTROM, M.; DE ROZIERES, S.; DE PARSEVAL, A.; GRANT, C. K.; LIN, Y. Molecular mechanisms of FIV infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 3-13, 2008.

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**. New York: John Wiley & sons, 1981.

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

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.

GASKELL, R. M.; GRUFFYDD-JONES, D. A. Intractable feline stomatitis **Vet Annual**, v. 17, p. 195-199, 1977.

GLEICH, S.; HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 552-558, 2009.

GONÇALVES, L. S.; FERREIRA, S. M. S.; SILVA JR., A.; VILLORIA, G. E.; COSTINHA, L. H.; COLOMBO, A. P. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results. **J Periodontol**, v. 76, p. 915-922, 2005.

GRANDE, S. R.; IMBRONITO, A. V.; OKUDA, O. S.; LOTUFO, R. F. M.; MAGALHAES, M. H. G.; NUNES, F. D. Herpesviruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, p. 838-845, 2008.

GRANDO, L. J.; YURGEL, L. S.; MACHADO, D. C.; SILVA, C. L.; MENEZES, M.; PICOLLI, C. [Oral manifestations, CD4+ T-lymphocytes count and viral load in Brazilian and North-American HIV-infected children]. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 1, p. 18-25, 2002.

HARA, M.; FUKUYAMA, M.; SUZUKI, Y.; KISIKAWA, S.; IKEDA, T.; KIUCHI, A.; TABUCHI, K. Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 3-4, p. 345-352, 1996.

HARBOUR, D. A.; CANEY, S. M. A.; SPARKES, A. H. Feline immunodeficiency virus infection. In: CHANDLER E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publisher, 2004. p. 607-622.

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.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. Feline herpesvirus 1 - associated facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1281-1290, 1999.

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

HARVEY, C. E. The oral cavity. In: CHANDLER E. A., GASKELL C. J., GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 379-395.

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.

HOSIE, M. J.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, D. A.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline immunodeficiency: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 575-584, 2009.

HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 75-118 p. 75-118.

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

HURLEY, K.; PESAVENTO, P. A.; PEDERSEN, N. C.; POLAND, A. M.; WILSON, E.; FOLEY, J. E. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. **J Am Vet Med Assoc**, v. 224, n. 2, p. 241-249, 2004.

HURLEY, K.; SYKES, J. E. Update on feline calicivirus: new trends. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 4, 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**. (Dissertação). VCM - Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

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.

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. **Vet Rec**, 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. **Vet Microbiol**, v. 27, n. 3-4, p. 205-219, 1991.

LEMOS, S. S.; OLIVEIRA, F. A.; VENCIO, E. F. Periodontal disease and oral hygiene benefits in HIV seropositive and AIDS patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 2, p. 417-421, 2010.

LOMMER, M. J.; VERSTRAETE, F. J. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, n. 2, p. 131-134, 2003.

LYON, K. F. Gingivostomatitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 4, p. 891-911, 2005.

MARSILIO, F.; DI MARTINO, B.; AGUZZI, I.; MERIDIANI, I. Duplex polymerase chain reaction assay to screen for feline herpesvirus-1 and *Chlamydophila* spp. in mucosal swabs from cats. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 295-298, 2004.

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

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Retroviridae. In: MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3rd ed. San Diego: Elsevier, v.1, p. 363-389, 2008.

NETER, J.; KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**: Irwin, 1996.

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

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

OSSIBOFF, R. J.; SHEH, A.; SHOTTON, J.; PESAVENTO, P. A.; PARKER, J. S. Feline caliciviruses (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. **J Gen Virol**, v. 88, p. 506-517, 2007.

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, p. 281-300, 2000.

PEDRETTI, E.; PASSERI, B.; AMADORI, M.; ISOLA, P.; DI PEDE, P.; TELERA, A.; VESCOVINI, R.; QUINTAVALLA, F.; PISTELLO, M. Low-dose interferon-alpha treatment for feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 245-254, 2006.

PESAVENTO, P. A.; CHANG, K. O.; PARKER, J. S. Molecular virology of feline calicivirus. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 38, n. 4, p. 775-786, vii, 2008.

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. **Arch Virol**, v. 145, n. 2, p. 243-261, 2000.

QUIMBY, J. M.; ELSTON, T.; HAWLEY, J.; BREWER, M.; MILLER, A.; LAPPIN, M. R. Evaluation of the association of Bartonella species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. **J Feline Med Surg**, v. 10, n. 1, p. 66-72, 2008.

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. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 7, p. 556-564, 2009.

RADFORD, A. D.; COYNE, K. P.; DAWSON, S.; PORTER, C. J.; GASKELL, R. M. Feline calicivirus. **Vet Res**, 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. **Int J Paediatr Dent**, v. 10, n. 1, p. 3-11, 2000.

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.; DANIEL, A. G. T.; STRAUSS, T. C. P.; TABORDA, C. P.; MARQUES, S. A. V.; HAIPEK, K.; OLIVEIRA, L. J.; MONTEIRO, J. M.; KFOURI, J. R. Cutaneous mycoflora and CD4:CD8 ratio of cats infected with feline immunodeficiency virus **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 355-358, 2010.

RECHE JR., A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical Study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 34, n. 3, p. 152-155, 1997.

REUBEL, G. H.; GEORGE, J. W.; BARLOUGH, J. E.; HIGGINS, J.; GRANT, C. K.; PEDERSEN, N. C. Interaction of acute feline herpesvirus-1 and chronic feline immunodeficiency virus infections in experimentally infected specific pathogen free cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 95-119, 1992.

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. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 8, p. 633-644, 2009.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. Massachusetts: PWS Publishers, 1986
SANTOS, L. C.; CASTRO, G. F.; DE SOUZA, I. P.; OLIVEIRA, R. H. Oral manifestations related to immunosuppression degree in HIV-positive children. **Braz Dent J**, v. 12, n. 2, p. 135-138, 2001.

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, p. 217-226, 2003.

SLOTS, J.; CONTRERAS, A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? **Oral Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 277-280, 2000.

STILES, J.; MCDERMOTT, M.; BIGSBY, D.; WILLIS, M.; MARTIN, C.; ROBERTS, W.; GREENE, C. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. **Am J Vet Res**, v. 58, n. 4, p. 338-342, 1997a.

STILES, J.; MCDERMOTT, M.; WILLIS, M.; ROBERTS, W.; GREENE, C. Comparison of nested polymerase chain reaction, virus isolation, and fluorescent antibody testing for identifying feline herpesvirus in cats with conjunctivitis. **Am J Vet Res**, v. 58, n. 8, p. 804-807, 1997b.

STILES, J.; POGRANICHNIY, R. Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. **J Feline Med Surg**, v. 10, n. 2, p. 154-159, 2008.

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. **Vet Microbiol**, v. 81, n. 2, p. 95-108, 2001.

SYKES, J. E.; STUDDERT, V. P.; BROWNING, G. F. Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. **Arch Virol**, v. 143, n. 7, p. 1321-1334, 1998.

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.; KONIG, M. Caliciviruses: an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 55-62, 1999.

THIRY, E.; 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.; RADFORD, A. D.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline herpesvirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 7, p. 547-555, 2009.

VAHLENKAMP, T. W.; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. F. Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 4752-4761, 2004.

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, n. 14, p. 340-342, 1993.

WEBB, C. B.; LEHMAN, T. L.; MCCORD, K. W. Effects of an oral superoxide dismutase enzyme supplementation on indices of oxidative stress, proviral load, and CD4:CD8 ratios in asymptomatic FIV-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 423-430, 2008.

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.

WESTERMEYER, H. D.; KADO-FONG, H.; MAGGS, D. J. Effects of sampling instrument and processing technique on DNA yield and detection rate for feline herpesvirus-1 via polymerase chain reaction assay. **Am J Vet Res**, v. 69, n. 6, p. 811-817, 2008.

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.

ZICOLA, A.; SAEGERMAN, C.; QUATPERS, D.; VIANDIER, J.; THIRY, E. Feline herpesvirus 1 and feline calicivirus infections in a heterogeneous cat population of a rescue shelter. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 12, p. 1023-1027, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Foto de gel de agarose corado com brometo de etídio após realização de RT-PCR e eletroforese apresentando quatro amostras positivas para o FCV (números 1, 2, 3 e 4), controle negativo (N) e controle positivo (POS) – São Paulo - 2010.

APÊNDICE B - Foto de gel de agarose corado com brometo de etídio após realização de NESTED-PCR e eletroforese apresentando sete amostras positivas para o FHV-1 (números 2, 3, 7, 8, 9, 10 e 12), controles negativos (N) e controle positivo (P) – São Paulo - 2010

APÊNDICE C – Imagem da mucosa oral de um gato apresentando gengivite grau 2. Notar hiperemia moderada da gengivite na margem dos dentes – São Paulo - 2010

APÊNDICE D - Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE C. Notar hiperemia moderada da gengivite na margem dos dentes e ausência de inflamação das fauces – São Paulo - 2010

APÊNDICE E – Imagem da mucosa oral de um gato apresentando gengivite grau 3. Notar hiperemia e hiperplasia da gengivite na margem dos dentes – São Paulo - 2010

APÊNDICE F - Imagem da cavidade oral do mesmo gato do APÊNDICE E. Notar hiperemia grave e hiperplasia da gengiva na margem dental e nas fauces – São Paulo - 2010

APÊNDICE G – Imagem da cavidade oral de um gato com gengivite grau 4. Notar hiperemia e hiperplasia graves de toda a gengiva e das fauces e ausência de alguns dentes – São Paulo - 2010