KATIA HAIPEK

Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos com gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV)

São Paulo

2006

Katia Haipek

**Avaliação das subpopulações de linfócitos T
CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+
em gatos com gengivite crônica e infectados
naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos
felinos (FIV)**

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
Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior

São Paulo
2006

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

890
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
8/6/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1706
FMVZ

Haippek, Katia

Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos com gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) / Kátia Haippek. – São Paulo: K. Haippek, 2006.

62 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2006.

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

Orientador: Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior.

1. Vírus imunodeficiência felina. 2. Gengivite. 3. Linfócitos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

PARECER

Interessado: Kátia Haipek

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 739/2005, intitulado: "Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+ E CD8+ em gatos com gengivite e infectados pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV)", utilizando 40 felinos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Archivaldo Reche Júnior, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 26 de setembro de 2005

Profa. Dra. Julia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HAIPEK, Katia

Título: Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos com gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV)

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

ODE AO GATO

Os animais foram
imperfeitos,
compridos de rabo, tristes
de cabeça.
Pouco a pouco se foram
compondo,
fazendo-se paisagem,
adquirindo pintas, graça vôo.
O gato,
só o gato apareceu completo
e orgulhoso:
nasceu completamente terminado,
anda sozinho e sabe o que quer.

O homem quer ser peixe e pássaro,
a serpente quisera ter asas,
o cachorro é um leão desorientado,
o engenheiro quer ser poeta,(...)
(...) mas o gato
quer ser só gato
e todo gato é gato do bigode ao rabo (...)

Não há unidade
como ele,
não tem
a lua nem a flor
tal textura:
é uma coisa
só como o sol ou o topázio,
e a elástica linha em seu contorno
firme e sutil é como
a linha da proa de uma nave.
o mar e a cidade incalculável,

Pablo Neruda

"O amor e a verdade estão unidos entre si, como as faces de uma moeda. É impossível separá-los. São as forças mais abstratas e mais poderosas desse mundo."

"O amor é a força mais sutil do mundo."

Mahatma Gandhi

Aos meus pais, Sonia e Paulo, minha avó, Lina, pelo amor incondicional.

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis..."

Fernando Pessoa

Ao Pedro, por todo amor, companheirismo e paciência.

Ao Prof. Dr. **Archivaldo Reche Junior**, meu orientador, pelos ensinamentos, conselhos únicos como professor e principalmente como amigo durante todos esses anos, não apenas durante a pós-graduação, mas desde o tempo de aluna e estagiária.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Silvia Ricci Lucas pelos ensinamentos desde a graduação e pela cumplicidade tanto na vida acadêmica quanto pessoal.

À Prof^a Márcia Mery, pelo apoio no desenvolvimento do projeto e dos alunos como seres humanos.

À Prof^a. Mitika K. Hagiwara, pelos ensinamentos transmitidos desde a graduação até os dias de hoje.

Ao Prof. Dr. Monthilo Russo do Departamento de Imunologia do ICB-USP, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilização do laboratório e pelas longas conversas e bons conselhos.

Ao Prof Dr. Jose Roberto, pela disponibilização de desenvolver parte do experimento no laboratório de Análises Imunológicas, do Departamento de Anatomia FMVZ-USP e pela possibilidade de conhecer e manter um vínculo de amizade com seus pós-graduandos e funcionários.

Aos amigos que me ajudaram muito durante o desenvolvimento do trabalho, tanto na parte técnica quanto na parte emocional, Luciana, Daniel e Lilian.

Às eternas e preciosas amigas que amo, e que me acompanharam desde o primeiro momento da faculdade até hoje Luciana, Juliana, Paula, Marina, Phaedra, Viviane, Lílian e Cláudia.

Aos colegas e amigos do HOVET que me apoiaram desde a época de estagiária, tanto na parte profissional e pessoal, e particularmente nos momentos engraçados da rotina: Bruna, Paula, Denise, Khadine, Julia, Vera e Mary.

Ao pessoal responsável pela limpeza do HOVET, principalmente à Cris, que tenho muito carinho.

Ao pessoal da clínica Animal Help pelo apoio profissional e pessoal, Viviane, Juca, Jeremias, Nazaré e Paulo.

Aos inesquecíveis amigos da turma 64, que passaram muitos momentos de angústia e felicidade ao meu lado.

Aos colegas da pós-graduação que lutaram junto comigo contra créditos, experimentos, estatísticas, etc...Mauricio, Helena, Pedro, Leila, Carol, Mônica, Tais, Milton (Tio Chico), Barreto, Jun, Ana, Tatiana, Luciana, Márcia, Fabio.

À minha razão de seguir em frente....os meus animais,... Rebeca, Luna, Magali, Paty, Lilica, Tuca, Clara, Barbosa, Bibi, Miguel, Filo, Oscarildo e Batata.

COLABORADORES

Aos amigos que me ajudaram na coleta, na parte laboratorial e aprenderam comigo as instruções dos equipamentos mais complicados LÍlian, Janaina, Rose, Luciana, Leila, Daniel e Pedro.

Ao laboratório de análises clínicas do HOVET –USP, Maria Helena da Silva Pelissari, Maria Luiza Franchini que sempre estavam dispostas a me orientarem e me ajudarem, mesmo depois do expediente e com grande rotina:

Aos enfermeiros que me ajudaram durante o experimento e que hoje tenho grande respeito e amizade: Milton Gregório dos Santos, Carlito dos Santos Belau, Gilberto Pereira da Cruz, Antonio Carlos Malaquias e Geraldo Natalino Tezzi.

À amiga Creide Donizete Costa que me acompanhou por anos, sempre me ajudou com todos os materiais do experimento e que hoje cultivo grande amizade e carinho.

Aos bolsistas que me ajudaram demais e que junto comigo passaram por momentos bons e ruins durante a fase experimental do projeto Alexandre (residente), Daniela e Roberta (residente).

RESUMO

HAIPEK, K. **Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos com gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV).** [Evaluation of CD4+ and CD8+ T-Lymphocytes count and CD4+:CD8+ ratio in cats with chronic gingivitis and naturally-infected with feline immunodeficiency virus (FIV)]. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A gengivite crônica e intratável observada em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um problema bastante freqüente na clínica de pequenos animais. O papel do FIV na etiologia da estomatite persistente ainda está por ser determinado. As manifestações orais são freqüentemente os primeiros sintomas observados em pacientes humanos infectados pelo HIV e podem ser usadas como indicadores da progressão da doença. O objetivo do presente estudo foi quantificar os linfócitos T CD4+, T CD8+ e a razão CD4+/CD8+ em uma colônia de gatos com gengivite crônica e naturalmente infectados pelo FIV. Para tanto, foram utilizados 20 gatos, todos apresentando gengivite com graus variando de 1 a 4. Desse total, 10 gatos não eram infectados pelo FIV e os outros 10 felinos eram infectados pelo FIV. Utilizou-se como controle 20 gatos sem gengivite, sendo 10 infectados pelo FIV e outros 10 não infectados pelo Retrovírus. As contagens dos linfócitos T CD4+ e CD8+ foram realizadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstraram que os gatos com gengivite e infectados pelo FIV apresentaram uma contagem significativamente menor de linfócitos T CD4+ quando comparado aos gatos com gengivite e não infectados pelo FIV. Não houve diferença significativa na contagem de linfócitos T CD8+

entre os gatos com gengivite, infectados ou não pelo FIV. A razão CD4⁺/CD8⁺ também se mostrou em declínio nos gatos com gengivite e infectados pelo FIV. Concluiu-se que nas condições do presente estudo, a infecção pelo FIV compromete a resposta imunológica de felino diante da inflamação gengival.

Palavras chaves: Vírus da imunodeficiência dos felinos. Gengivite. Linfócitos.

ABSTRACT

HAIPEK, K. Evaluation of CD4+ and CD8+ T-Lymphocytes count and CD4+:CD8+ ratio in cats with chronic gingivitis and naturally-infected with feline immunodeficiency virus (FIV) [Avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e da razão CD4+/CD8+ em gatos com gengivite crônica e infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV)]. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Chronic and intractable gingivitis in FIV-infected cats is a relatively common clinical problem in veterinary practice. The role of FIV in the etiology of persistent stomatitis is still undetermined. Oral manifestations often found in HIV-infected people are frequently the first clinical sign of the infection and can be considered as an indicator of the progression of the HIV infection. The purpose of this study was to evaluate the CD4+ and CD8+ T-lymphocytes count and CD4+:CD8+ ratio in a colony of cats with chronic gingivitis. To achieve these goals, a colony of twenty domestic shorthair cats was used. All cats had some degree of gingival inflammation with scores ranging from 1 through 4. Ten cats were FIV-positive and ten were FIV-negative. As a control, twenty cats without gingivitis were used (ten cats were FIV-positive and ten were FIV-negative). CD4+ and CD8+ T-lymphocytes counts were performed by means of flow cytometry in all forty cats and results compared. The results showed that cats with gingivitis and FIV-infected had a lower CD4+ T cells count than cats with gingivitis but not FIV-infected. There was no difference in CD8+ T lymphocytes count among the cats with gingivitis infected or not with the FIV. The CD4+:CD8+ ratio was lower in cats with gingivitis and FIV-infected. One can conclude that FIV infection induces immunological disorders in cats with gingival inflammation.

Key Words: Feline immunodeficiency virus. Gingivitis. Lymphocytes.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Figuras (1 a 4) de animais com presença de doença gengival crônica, pertencentes aos grupos III e IV.....	51
APÊNDICE B -	Figuras (5 a 8) que ilustram a citometria de fluxo representada por um animal de cada grupo.....	55
APÊNDICE C -	Quadros (1 a 4) com descrição dos animais pertencentes em cada grupo de análise.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos totais, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006.....	36
Gráfico 2 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos totais, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006.....	36
Gráfico 3 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD4+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006.....	37
Gráfico 4 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD4+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006.....	37
Gráfico 5 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD8+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006.....	38
Gráfico 6 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD8+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006.....	38
Gráfico 7 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão da relação entre os números de linfócitos CD4+/CD8+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006.....	39
Gráfico 8 -	Comparação dos valores da média e desvio padrão da relação entre os números de linfócitos CD4+/CD8+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS.....	29
3.2	EXAME FÍSICO.....	30
3.3	EXAMES COMPLEMENTARES	30
3.3.1	Leucograma	30
3.3.2	Teste sorológico (ELISA)	30
3.3.3	Fenotipagem das subpopulações de linfócitos periféricos cd4+ e cd8+ pela técnica de citometria de fluxo.....	31
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	LINFÓCITOS.....	36
4.2	CD4+.....	37
4.3	CD8+	38
4.4	CD4+/CD8+.....	39
5	DISCUSSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICES.....	55

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias da cavidade oral de felinos são comuns no cotidiano da prática clínica (FROST; ILLIAN, 1986; GRUFFYDD-JONES, 1991).

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

O complexo gengivite-estomatite felina pode ser comparado com a gengivite úlcero-necrozante aguda e doença inflamatória periodontal que acontece em humanos (LYON, 2005).

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

hiperplasia e/ou ulceração gengival, podendo haver perda de dentes; quatro (4) gengivite muito severa, em que o paciente deverá apresentar hiperemia gengival bastante evidente, hiperplasia e/ou ulcerações gengivais generalizadas, perda de vários dentes e friabilidade de margens gengivais.

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

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

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

As bactérias alojadas no sulco gengival começam a produzir toxinas (hialuronidases e enzimas lisossomais), que aliadas ao grande fluxo de células inflamatórias para o local afetado irritam a gengiva, e começam a desencadear uma reação inflamatória determinando inchaço gengival, eritema e friabilidade do tecido. (DEIHL; ROSYCHUK, 1993; GRUFFYDD-JONES, 1991; HARVEY, 1991). Com a perda da integridade da mucosa, as bactérias por sua vez se alojam nas estruturas do periodonto, causando a

periodontite (LYON, 2005). A gengivite e estomatite crônica ocorrem, devido resposta imune à ação bacteriana e a interação com os mecanismos de defesa local. A resposta em cada região em que está localizada a placa bacteriana é regulada individualmente pelo sistema imune local (SIMS et al., 1990).

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

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

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

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

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

A cinética da infecção pelo FIV e pelo HIV é muito semelhante (DIEHLA et al., 1995). Quando os gatos se infectam, naturalmente ou são inoculados experimentalmente, partículas virais são encontradas no plasma num período que varia de 3 a 4 semanas após a infecção. Em gatos experimentalmente infectados, os sintomas como letargia, febre intermitente e linfadenomegalia transitória, normalmente acompanham esse período de infecção aguda. No entanto, nos casos de infecção natural, essa fase é pouco perceptível. O animal entra então na fase de infecção latente ou

assintomática, a qual pode durar muitos anos sem que o felino apresente quaisquer anormalidades clínicas (BENDINELLI et al., 1995).

Muitos eventos importantes ocorrem na fase inicial da infecção pelos FIV ou HIV que podem certamente influenciar o curso da doença. Nessa primeira fase, a carga viral é bastante alta, bem como a capacidade de multiplicação do vírus, determinando a geração de variantes virais, o que parece ser importante para determinar o curso da doença. A replicação e a disseminação viral, nessa fase da infecção, normalmente são controladas pelos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro, sendo a infecção e depleção de linfócitos T CD4⁺ uma das principais características da patogenia da doença. As células CD8⁺ e linfócitos B são infectados posteriormente na fase crônica da enfermidade (BARLOUGH et al., 1991; DEAN, 1996; OBERT, 2000; PANG et al., 1992; VON SYDOW et al., 1988). Nos estudos realizados por Obert, em 2000, observou-se que na síndrome da imunodeficiência viral felina, há expansão dos linfócitos B (representadas pelo CD45R⁺), em contraste ao declínio dos linfócitos T CD4⁺, levando a uma diminuição da razão CD4⁺/CD8⁺.

Em fase assintomática da doença podemos observar queda gradual e lenta dos níveis de linfócitos T CD4⁺ presente na circulação periférica.

Dentre outras causas de perda de linfócitos T CD4⁺ incluem-se a diminuição da produção devido à infecção do timo e da medula óssea, a lise das células infectadas, induzida pelo vírus (efeito citotóxico) e a indução de apoptose (HOLZNAGEL et al., 1998). De fato, a inibição da apoptose com o uso de antioxidantes biológicos parece diminuir, *in vitro*, a destruição de linfócitos infectados pelo FIV (MORTOLA et al., 1998).

Estudos têm demonstrado que pacientes humanos que apresentam uma boa resposta imunológica na fase inicial da infecção pelo HIV, têm uma expectativa de vida maior, ou seja, a capacidade de resposta imunológica do paciente, nessa fase, está diretamente relacionada ao tempo de sobrevivência do mesmo (DESROSIERS, 1990; SHEPPARD et al., 1991).

Embora não se tenha dúvida de que o FIV contribua para o desenvolvimento de sérias doenças no gato, a proporção de gatos infectados que desenvolvem doenças é ainda desconhecida. De fato, existem inúmeros exemplos de gatos idosos que são infectados por até 10 anos e se mantêm perfeitamente hígidos (JARRET, 1999).

Os estágios da infecção pelo FIV baseiam-se em critérios clínicos (BENDINELLI et al., 1995). No estágio I da infecção, os gatos apresentam febre e leucopenia, que dura de 4 a 9 semanas, no entanto, muitos gatos passam por este estágio sem sintomas aparentes. O estágio II corresponde ao período de portador assintomático, podendo durar meses a anos sem que o gato apresente sintomas. Nesse estágio observa-se queda contínua e gradual no número de células T CD4+, aumento das células T CD8+ e inversão da razão CD4+/CD8+. No estágio III, os gatos demonstram linfonodomegalia generalizada persistente. O estágio IV é marcado por uma depleção significativa do sistema imunológico do felino infectado, que passa a apresentar doenças de natureza crônica. As gengivites são extremamente freqüentes nessa fase da doença. No estágio V o paciente encontra-se em franca síndrome de imunodeficiência adquirida, que corresponde à fase final da infecção, com depleção acentuada de linfócitos T CD4+ e CD8+. A síndrome de imunodeficiência adquirida ocorre meses a anos após a infecção

pelo FIV e está associada com infecções secundárias e oportunistas severas, doenças neoplásicas e neurológicas (ENGLISH et al., 1994). Dentre as doenças neoplásicas descritas em gatos infectados pelo FIV as mais freqüentes são linfomas, fibrossarcomas, doenças mieloproliferativas e mastocitoma (BENDINELLI et al., 1995; HUTSON et al., 1991; WILLIS, 2000).

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 (GRUFFYD-JONES, 1991; HARVEY, 1994; KNOWLES et al., 1989; SHELTON et al., 1989; WATERS et al., 1993; WILLIS, 2000; YAMAMOTO et al., 1989; ZENGER, 1990). Sugere-se que a severa disfunção imunológica determinada pelo FIV seja o principal fator responsável pelo desenvolvimento da inflamação gengival, associada ou não a alterações da microbiota local (TENORIO et al., 1991). 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).

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

Corroboram com tais informações a evidência de que o uso de fármacos anti-HIV proporcionam melhora clínica significativa das lesões orais,

em pacientes infectados pelo HIV e com gengivite crônica. Concluindo-se que tal melhora deva estar relacionada a um aumento no número de linfócitos T CD4+, devido ao uso do anti-viral (CEBALLOS-SALOBRENA et al., 2000).

Em medicina veterinária, não existem estudos correlacionando a gravidade da doença gengival em felinos, infectados ou não pelo FIV, com o número de células CD4+ e CD8+.

2 OBJETIVO

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Quantificar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ , CD8⁺, e a razão CD4⁺/CD8⁺ em gatos com gengivite e infectados pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, utilizando-se como controles gatos com gengivite e não infectados pelo FIV. Ainda, na tentativa de se estabelecer a influência do número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no aparecimento e curso da gengivite, essas células foram quantificadas também em outros dois grupos de estudo compostos por gatos sem gengivite, sendo um deles formado por gatos FIV positivos e o segundo por gatos FIV negativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 felinos pertencentes a uma colônia de gatos, localizada na região de Parelheiros em São Paulo.

Todos os animais foram submetidos ao teste sorológico imunoenzimático (ELISA), como forma de triagem para determinar se estavam ou não infectados pelo Retrovírus da imunodeficiência felina. Também foi realizada inspeção da cavidade oral dos animais para avaliar a presença de lesões de mucosa gengival e classificar o grau de gengivite. Desta forma os animais foram separados em 4 grupos.

GRUPO I: composto por 10 gatos, machos e fêmeas, de idades e raças variadas, sem gengivite e não infectados pelo FIV.

GRUPO II: composto por 10 gatos, machos e fêmeas, de idades e raças variadas, sem gengivite e infectados pelo FIV. Baseando-se em critérios clínicos, esses animais encontravam-se no estágio II da infecção.

GRUPO III: composto por 10 felinos, machos e fêmeas, de idades e raças variadas, com gengivite graus 3 ou 4, e não infectados pelo FIV.

GRUPO IV: composto por 10 felinos, machos e fêmeas, de idades e raças variadas, com diferentes graus de gengivite e portadores do vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV). Baseando-se em critérios clínicos, esses animais encontravam-se no estágio IV da infecção.

3.2 EXAME FÍSICO

Todos os animais selecionados para os experimentos foram avaliados clinicamente, segundo metodologia empregada no Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP.

3.3 EXAMES COMPLEMENTARES

3.3.1 Leucograma

Foram colhidas amostras de sangue total (5ml) dos animais, através da venipunctura jugular ou cefálica e armazenadas em tubos estéreis contendo anticoagulante (EDTA). As contagens globais de leucócitos foram realizadas utilizando-se sistema automatizado (Serono® – System 9020AX). O exame diferencial dos leucócitos foi realizado a partir de esfregaços de sangue preparados a fresco e corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

3.3.2 Teste Sorológico (ELISA)

O teste sorológico (ELISA) – IDDEX¹ para detecção de anticorpos anti-FIV em gatos foi utilizado como forma de triagem dos animais para determinar quais estavam ou não infectados pelo vírus da imunodeficiência dos felinos.

Os testes foram realizados com amostras de sangue total seguindo-se as instruções do fabricante.

3.3.3 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 40 felinos utilizados no experimento, pela técnica de citometria de fluxo (BYRNE et al., 2000).

A citometria de fluxo é uma técnica que simultaneamente mensura e analisa as múltiplas características físicas de partículas simples, geralmente de células, suspensas em um sistema de fluxo, desenvolvido de tal forma a permitir que estas células passem por um ponto de luz (laser). Quando as células passam por este laser, sua sombra e sua fluorescência são registradas por um leitor óptico e são lidas por um computador.

A citometria de fluxo mede o tamanho, granulosidade, complexidade interna e fluorescência relativa da célula. Estas propriedades permitem separar fisicamente subpopulações celulares.

De todos os felinos, previamente selecionados, foram coletadas amostras de 5 ml de sangue em frascos contendo EDTA como anticoagulante dos animais previamente selecionados. Estas amostras foram mantidas à temperatura ambiente e processadas no prazo de 4 horas após a colheita.

Para a técnica de citometria utilizou-se 200µL do sangue total em tubos com solução de lise, incubado por 15 minutos. Cada amostra foi lavada

¹ IDEXX Laboratories, Inc. One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA

com PBS 5%, centrifugada por 8 minutos a 1800 RPM para obtenção do pellet.

O pellet foi incubado por 35 minutos com 25µL de anticorpo monoclonal específico CD4+ (FITC) e CD8+(RPE) previamente diluído em solução tampão. Após a incubação foram realizadas duas lavagens com 200µl de solução tampão FACS, por 5 minutos a 1600rpm.

As amostras foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste Bartlett para avaliar se a análise indicada seria paramétrica ou não paramétrica. Este teste apontou a análise paramétrica como a mais eficiente para os dados em questão, sendo realizado, portanto o teste ANOVA de duas vias. O teste de Bonferroni (como *post-hoc*), foi utilizado para avaliar a influência de dois estímulos nos diferentes grupos experimentais.

Foi utilizado o programa PRISMA para auxílio dos cálculos.

4 RESULTADOS

No presente estudo foi utilizado 40 felinos, sendo 10 animais de cada grupo: grupo I (não infectados pelo FIV e sem gengivite); grupo II (infectados pelo FIV e sem gengivite); grupo III (não infectado pelo FIV e com gengivite) e grupo IV (infectados pelo FIV e com gengivite) (Quadros 1, 2, 3 e 4 - Apêndice C)(Apêndice A).

Os resultados da citometria de fluxo foram comparados em relação a cada animal e em relação a cada grupo (Gráficos 1 a 8) (Apêndice B).

Analisando os gatos não infectados pelo retrovírus, podemos observar que a presença de gengivite crônica tende a causar aumento do número de linfócitos totais, porém sem diferença estatística significativa ($3726,5 \pm 1469,1$ vs $3501,7 \pm 1898,4$, $p > 0,05$) (Gráfico 1). Quando analisamos os animais portadores da imunodeficiência observamos que os animais com gengivite tendem a apresentar menor número de linfócitos quando comparados aos animais sem gengivite crônica ($2843 \pm 1087,0$ vs $3514 \pm 2048,6$, $p > 0,05$) (Gráfico 1).

Entre os gatos sem gengivite não houve diferença quando comparamos os infectados pelo retrovírus aos felinos livres do FIV ($3514 \pm 2048,6$ vs $3501,7 \pm 1898,4$ $p > 0,05$) (Gráfico 2). Quando comparamos os animais com gengivite observamos que os gatos infectados pelo FIV apresentaram número de linfócitos totais menor, em comparação aos gatos

não infectados pelo Retrovírus ($2843,0 \pm 1087,0$ vs $3726,5 \pm 1469,1$ $p > 0,05$) (Gráfico 2).

A inflamação gengival elevou de forma significativa o número de linfócitos T CD4+ entre os gatos não infectados pelo FIV ($1144,0 \pm 531,9$ vs $616,1 \pm 324,0$, $p < 0,05$) (Gráfico 3). O mesmo padrão pôde ser observado entre os grupos com síndrome da imunodeficiência, ou seja, os animais com gengivite crônica apresentaram significativo aumento do número de linfócitos T CD4+ em comparação aos animais sem gengivite ($623,4 \pm 247,5$ vs $190,3 \pm 70,0$, $p < 0,05$) (Gráfico 3).

Comparando-se os gatos sem gengivite, infectados ou não pelo FIV, observou-se que a contagem de linfócitos T CD4+ foi significativamente menor entre os gatos infectados pelo retrovírus ($190,3 \pm 70,0$ vs $616,1 \pm 324,0$ $p < 0,05$) (Gráfico 4). O mesmo padrão foi observado quando comparamos os grupos com gengivite, infectados ou não pelo FIV, ou seja, os animais com imunodeficiência dos felinos apresentam número de linfócitos T CD4+ significativamente menor quando comparados aos animais livres de infecção ($623,4 \pm 247,5$ vs $1144,0 \pm 531,9$, $p < 0,05$) (Gráfico 4).

Com relação ao número de linfócitos T CD8+ observamos que há elevação do número de linfócitos na presença de inflamação gengival crônica quando comparamos grupos de animais não infectados pelo retrovírus ($616,5 \pm 285,3$ vs $390,8 \pm 200,4$, $p > 0,05$) (Gráfico 5) embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Em contrapartida, quando comparamos os animais com infecção pelo FIV, observamos diminuição no número de

linfócitos T CD8+ em animais com gengivite ($547,4 \pm 188,8$ vs $653,6$ vs $418,8$, $p > 0,05$) (Gráfico 5).

Entre os gatos sem gengivite há elevação do número de linfócitos T CD8+ quando comparamos o grupo infectado com o grupo livre de infecção pelo FIV ($653,6 \pm 418,8$ vs $390,8 \pm 200,4$, $p > 0,05$) (Gráfico 6). Com relação aos gatos com gengivite, infectados ou não pelo FIV, não houve diferença significativa na contagem de linfócitos T CD8+ ($547,4 \pm 188,8$ vs $616,56 \pm 285,35$ $p > 0,05$) (Gráfico 6).

Com relação a razão CD4+/CD8+ a inflamação gengival determinou um aumento na razão CD4+/CD8+, tanto entre os gatos infectados pelo FIV ($0,5 \pm 0,4$ vs $1,1 \pm 0,4$ $p > 0,05$) (Gráfico 7) quanto nos livres do retrovírus ($1,1 \pm 0,5$ vs $2,3 \pm 1,06$ $p < 0,001$) (Gráfico 7), apesar de não haver diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos com FIV. No entanto, os gatos com gengivite e infectados pelo FIV apresentaram uma razão CD4+/CD8+ significativamente menor comparada à encontrada nos gatos não infectados ($1,1 \pm 0,4$ vs $2, \pm 1,06$ $p < 0,001$) (Gráfico 8). Observamos também que a infecção pelo retrovírus felino causa uma diminuição na razão CD4+/CD8+ entre os gatos sem gengivite ($1,1 \pm 0,5$ vs $0,5 \pm 0,4$ $p < 0,05$) (Gráfico 8), apesar de não haver diferença estatística significativa.

4.1 LINFÓCITOS

Gráfico 1 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos totais, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006

Gráfico 2 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos totais, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006

4.2 CD4+

*Diferença estatística $p < 0,05$

Gráfico 3 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD4+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006

* Diferença estatística $p < 0,05$

Gráfico 4 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD4+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006

4.4 CD8+

Gráfico 5 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD8+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006

Gráfico 6 - Comparação dos valores da média e desvio padrão dos números de linfócitos T CD8+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006

4.5 CD4+/CD8+

* Diferença estatística $p < 0,001$

Gráfico 7 - Comparação dos valores da média e desvio padrão da relação entre os números de linfócitos CD4+/CD8+, obtidos nos grupos de gatos infectados ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos, segundo a presença ou não de gengivite. São Paulo, 2006

* Diferença estatística $p < 0,001$

Gráfico 8 - Comparação dos valores da média e desvio padrão da relação entre os números de linfócitos CD4+/CD8+, obtidos nos grupos com ou sem gengivite, segundo a infecção ou não pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. São Paulo, 2006

5 DISCUSSÃO

A gengivite crônica associada à infecção pelo FIV é bastante freqüente, sendo muitas vezes severa e indolente. Na atualidade, o principal tratamento empregado para o controle das gengivites crônicas em gatos, associadas ou não a infecção pelo FIV, é o uso de glicocorticóides (HARVEY, 1994). Classicamente, os efeitos imunossupressores desses fármacos têm limitado sua utilização em pacientes felinos ou mesmo em humanos, com doenças que comprometam direta ou indiretamente a imunidade. Os glicocorticóides podem interferir na resposta imunológica celular de diferentes maneiras, sendo a mais importante a diminuição da blastogênese dos linfócitos T, determinando uma diminuição transitória no número de células CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, esses fármacos também inibem a resposta imunológica celular pela diminuição efetiva da apresentação do antígeno às células T (COHN, 1997; SAUMA et al., 2002). Estudos *in vitro* demonstram que não existe comprometimento da resposta imunológica humoral de gatos infectados pelo FIV e submetidos ao tratamento com esteróides, no entanto, a atividade anti-viral mediada por células (CD8⁺) parece estar diminuída (BARR et al., 2000). Portanto, a avaliação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e a razão CD4/CD8 em gatos infectados pelo FIV e com gengivite crônica assume importância fundamental para o uso racional de esteróides no tratamento desses pacientes.

Os felinos utilizados neste estudo foram selecionados entre a faixa etária de 1 a 5 anos. A idade mínima foi determinada a partir de um estudo

realizado por Holmstrom (2005) em que foi demonstrado que os gatos iniciam o processo de gengivite a partir dos 9 meses de idade, pelo acúmulo de placas e cálculos sobre os dentes. Foi também estabelecida a idade limite de 5 anos, para que não houvesse influência da idade avançada sobre o sistema imunológico.

Na análise dos resultados, observou-se marcante diminuição do número de linfócitos T CD4+ circulantes nos gatos infectados pelo FIV e sem gengivite, a semelhança do relatado por Macy, 1994. No entanto, quando analisamos os linfócitos totais circulantes, não se detectou linfopenia estatisticamente significativa nos gatos infectados pelo FIV em relação aos animais não infectados. Sabe-se que os felinos infectados pelo FIV tendem a linfopenia que se acentua com a progressão da infecção, tal mecanismo de depleção das células se dá através da indução viral à ativação do mecanismo de apoptose das células TCD4+ e T CD8+, dentre outros (HOLM, 2005; REGAMEY et al., 1999). A observação de discreta linfopenia nos animais infectados pelo FIV no presente estudo poderia estar relacionada ao aumento do número de linfócitos B ou mesmo de outras subpopulações de linfócitos T, compensando assim a diminuição significativa dos linfócitos T CD4+, uma vez que não houve uma variação significativa no número de linfócitos T CD8+.

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. (DEIHL; ROSYCHUK, 1993; GRUFFYDD-JONES, 1991; HARVEY, 1991). Portanto, para que ocorra a migração de células inflamatórias para a gengiva, essas células precisam

ser recrutadas da periferia, desta forma espera-se o aumento dessas células na circulação, mesmo que momentaneamente. De fato, Odden et al. (1995) descreve a alta prevalência de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD3+ no tecido gengival de pacientes humanos com gengivite crônica e infectados pelo HIV. Quando analisamos os resultados do presente estudo, pertinente aos gatos com gengivite crônica, nota-se que há um aumento significativo na contagem de linfócitos T CD4+, independentemente do gato, ser ou não infectado pelo FIV.

Curiosamente, entre os gatos infectados pelo FIV, observou-se maior número de linfócitos T CD4+ nos animais do grupo com gengivite, mesmo estes animais tendo sido enquadrados no estágio IV da infecção. Este fato demonstra que ainda existe resposta imunológica ativa mediante infecções oportunistas, mesmo em estágios mais avançados da infecção, apesar da síndrome de imunodeficiência (NORRIS, 2001). No entanto, o fato dos gatos infectados pelo FIV e com gengivite apresentarem uma elevação no número de linfócitos T CD4+, não significa que essas células estejam preservadas funcionalmente, uma vez que a infecção pelo retrovírus pode determinar alterações qualitativas nessa linhagem celular (JARRET, 1999).

Ainda, deve-se ressaltar que nos gatos infectados pelo FIV e com gengivite, a contagem dessas células foi bastante inferior quando comparada a dos gatos não infectados. Tal resposta parece ser bastante coerente, considerando-se que os gatos infectados pelo retrovírus são depletados de linfócitos T CD4+ (GRUTERS et al., 1990; REGAMEY et al., 1999), o que também pôde ser comprovado no presente trabalho.

Além das bactérias, o herpesvírus e o calicivírus também poderiam potencializar a inflamação gengival de gatos com gengivite crônica (HARGIS, 1983). Sabendo-se que tais agentes são oportunistas e a imunossupressão poderia facilitar sua instalação, deve ser bastante provável que os gatos infectados pelo FIV, por serem depletados de linfócitos T CD4+ tenham uma alta prevalência de infecção por esses agentes virais, no entanto, inexistem trabalhos na literatura veterinária correlacionando a ocorrência desses agentes virais em gatos com gengivite crônica e infectados pelo FIV.

No que se refere à contagem de linfócitos T CD8+, constatou-se que os gatos infectados pelo FIV e com gengivite apresentaram uma contagem celular inferior a observada entre os gatos também infectados pelo FIV e sem gengivite.

Poder-se ia explicar tal fato, à severidade a inflamação gengival, onde mais células inflamatórias seriam recrutadas para o local, diminuindo assim o número de linfócitos T CD8+ circulantes (HOWELL et al., 1996; ODDEN et al., 1995). No entanto, entre os gatos não infectados pelo FIV, observou-se aumento na contagem de linfócitos T CD8+, embora não significativo, entre os animais com gengivite severa.

Deve-se considerar que no presente estudo, os gatos infectados pelo FIV e com gengivite, baseando-se em critérios clínicos, encontram-se no IV estágio da infecção pelo FIV, enquanto que os gatos infectados pelo FIV e sem gengivite, foram enquadrados no II estágio.

Tal fato poderia explicar a diminuição da população de linfócitos T CD8+, uma vez que no progresso da infecção pelo Retrovírus há diminuição significativa do número de linfócitos T CD8+ (BARLOUGH, 1991; DEAN, 1996; OBERT, 2000)

Nas condições do presente estudo, a razão CD4+/CD8+ mostrou-se diminuída significativamente nos gatos infectados pelo FIV, e a gengivite acabou por elevar consideravelmente essa razão. Esse aumento foi devido à alta contagem de linfócitos T CD4+ encontrada nos gatos com gengivite, infectados ou não pelo FIV, embora os gatos infectados pelo Retrovírus tenham apresentado uma elevação na razão CD4+/CD8+ inferior a demonstrada pelos gatos com gengivite e livres do Retrovírus. Esse fato é de grande importância prognóstica, uma vez que se espera uma diminuição na razão CD4+/CD8+ nos animais infectados pelo FIV, havendo uma relação direta entre a diminuição da razão e prognóstico. Portanto, a elevação da razão CD4+/CD8+ , secundária a gengivite poderia mascarar a magnitude real da infecção viral.

A análise dos resultados deste estudo permite-nos concluir que os gatos infectados pelo FIV e com gengivite crônica, apresentaram uma resposta imunológica parcial, frente à inflamação gengival, quando comparados aos gatos não infectados pelo FIV. Tal fato demonstra que o uso de glicocorticóides para o tratamento da gengivite crônica nos gatos infectados pelo retrovírus deva ser usado com cautela, para que não ocorra um comprometimento ainda maior da resposta imunológica mediada pelos linfócitos T CD4+ e CD8+.

Conclui-se também que a infecção pelo FIV deve ter uma participação secundária na etiopatogenia da gengivite crônica dos gatos, uma vez que a inflamação gengival severa foi também encontrada em gatos não infectados pelo FIV.

REFERÊNCIAS

BARLOUGH, J. E.; ACKLEY, C. D.; GEORGE, J. W.; LEVY, N.; ACEVEDO, R.; MOORE, P. F.; RIDEOUT, B. A.; COOPER, M. D.; PEDERSEN, N. C. Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 4, n. 3, p. 219-227, 1991.

BARR, M. C.; HUITRON-RESENDIZ, S.; SELWAY, D. R.; HENRIKSEN, S. J.; PHILLIPS, T. R. Exogenous glucocorticoids alter parameters of early feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 576-586, 2000.

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

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

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

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

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

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

DEAN, G. A.; REUBEL, G. H.; MOORE, P. F. Proviral burden and infection kinetics of feline immunodeficiency virus lymphocyte subsets on blood and lymph node, **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5165-5191, 1996.

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

DESROSIERS, R. C. The simian immunodeficiency viruses. **Annual Review of Immunology**, v. 8, p. 557-558, 1990.

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

ENGLISH, R. V.; NELSON, P.; JOHNSON, C. M.; NASISSE, M.; TOMPKINS, W. A.; TOMPKINS, M. B. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 3, p. 543-552, 1994.

FROST, P.; WILLIAMS, C. A. Feline Dental Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 16, n. 5, p. 851-873, 1986.

GASKELL, R. M.; GRUFFYD-JONES, T. J. Intractable feline stomatitis. **Veterinary Annual**, n. 20, v. 17, p. 195-199, 1977.

GRUFFYD-JONES, T. J. Gingivitis and Stomatitis. In AUGUST, J. R. **Consultations in Feline Internal Medicine**. Philadelphia; WB Saunders, 1991, v. 3, p. 397-402.

GRUTERS, R. A.; TERPSTRA, F. G.; DE JONG, R.; VAN NOESEL, C. J.; VAN LIER, R. A.; MIEDEMA, F. Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 5, p. 1039-1044. 1990.

HARGIS, A.M.; PRIEUR, D.J.; GAILLARD, E.T. Chlamydial infection of the gastric mucosa in twelve cats, **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 2, p. 170-178, 1983.

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

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

HOLM, G.; GABUZDA, D. Distinct mechanisms of CD4 and CD8 T-Cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions, **Journal of Virology**, v. 79, n. 10, p. 6299-6311, 2005.

HOLMSTROM, S. E.; BELLWOS, J.; COLMERY, R.; CONWAY, M. L. Dental care guidelines for dogs and cats, **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 41, n. 5, p. 277-283, 2005.

HOLZNAGEL, E.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LEUTENEGER, C.M.; ALLENSPACH, K.; HUETTNER, S.; FOSTER, U.; NIEDERER, E.; JOLLER, H.; WILLETT, B. J.; HUMMEL, U.; SCHUPBACH, J.; LUTZ, H. The role of in vitro-induced lymphocyte apoptosis in feline immunodeficiency virus infection: correlation with different markers of disease progression. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 9025-9033, 1998.

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 Dentistry**, n. 18, v. 2, p.117-120, 1996.

HUTSON, C. A.; RIDEOUT, B. A.; PEDERSEN, N. C. Neoplasia associated with feline immunodeficiency virus infection in cats of southern California. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1357-1362, 1991.

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

KNOWLES, J. O.; GASKELL, R. M.; GASKELL, C. J.; HARVEY, C. E.; LUTZ, H. Prevalence of feline calicivirus, feline leukemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. **The Veterinary Record**, v. 1, p. 336-338, 1989.

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

MACY, D. W, Feline immunodeficiency virus, **In: SHERDING, R.G., The cat: diseases and clinical management**, 2 ed, 1994, p. 433-448, v. 1.

MORTOLA, E.; OKUDA, M.; OHNO, K.; WATARI, T.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Inhibition of apoptosis and virus replication in feline immunodeficiency virus-infected cells by N-acetylcysteine and ascorbic acid. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 11, p. 1187-1193, 1998.

NORRIS, P. J., ROSENBERG, E. S. Cellular immune response to human immunodeficiency virus, **AIDS**, v. 15, n. 2, p. 16-21, 2001.

OBERT, L. A.; HOOVER, E.A. Relationship of lymphoid lesions to disease course in mucosal feline immunodeficiency virus type C infection. **Veterinary Pathology**, v. 5, n. 37, p. 386-401, 2000.

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

PANG, S.; SHLESINGER, Y.; DAAR, E. S.; MOUDGIL, T.; HO, D. D.; CHEN, I. S. Rapid generation of sequence variation during primary HIV-1 infection. **AIDS**, v. 6, n. 5, p. 453-460, 1992.

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.

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

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

REGAMEY, N.; TAMM, M.; BINET, I.; THIEL, G.; ERB, P.; CATHOMAS, G. Transplantation-associated Kaposi's sarcoma: herpesvirus 8 transmission through renal allografts. **Transplantation Proceedings**, v. 31, n.1-2, p. 922-923, 1999.

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

SHELTON, J. H.; WALTIER, R. M.; CONNOR, S. L. Prevalence of feline immunodeficiency virus and leukemia virus infection in pet cats. **Journal of American Animal Hospital Association**. v. 27, p. 7-12, 1989.

SHEPPARD, H. W.; ASCHER, M. S.; MCRAE, B.; ANDERSON, R. E.; LANG, W.; ALLAIN, J. P. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 4, n. 7, p. 704-712, 1991.

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

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

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. **Veterinary Immunology and Immuno-Pathology**, v. 29, p. 1-4, 1991.

VON SYDOW, M.; GAINES, H.; SONNERBORG, A.; FORSGREN, M.; PEHRSON, P.O.; STRANNEGARD, O. Antigen detection in primary HIV infection. **British Medical Journal**, v. 296, n. 6617, p. 238-240, 1988.

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. **Veterinary Record**, v. 132, p. 340-342, 1993.

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

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

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

APÊNDICE A - Figuras (1 a 4) de animais com presença de doença gengival crônica, pertencentes aos grupos III e IV.

Figura 1 - Animal macho, 5 anos, sem raça definida, pertencente ao grupo IV. Presença de halo gengival hiperêmico ao redor dos dentes, mobilidade dentária, halitose intensa, presença de ulceração em mucosa. São Paulo, 2006

Figura 2 - Animal macho, 4 anos, sem raça definida, pertencente ao grupo IV. Presença de halo gengival hiperêmico ao redor dos dentes, mobilidade dentária, halitose intensa, presença de ulceração em mucosa. São Paulo, 2006

Figura 3 - Animal fêmea, 4 anos, sem raça definida, pertencente ao grupo IV. Presença de intensa úlcera na região glosso-faríngea, com hiperplasia gengival intensa. São Paulo, 2006

Figura 4 - Animal fêmea, 2 anos, sem raça definida, pertencente ao grupo III. Presença de halo gengival hiperêmico ao redor dos dentes, mobilidade dentária, halitose intensa, presença de ulceração em mucosa. São Paulo, 2006

APÊNDICE B - Figuras (5 a 8) que ilustram a citometria de fluxo representada por um animal de cada grupo.

Figura 5 - Análise da citometria de fluxo, com ilustração da fluorescência das células sangüíneas do gato pertencente ao grupo I, sem infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e sem doença gengival grave. (A) A figura ilustra o citograma de todas as células da linhagem branca analisadas em uma amostra de sangue. Observa-se a população de linfócitos representada pelo "gate". (B) A figura ilustra isoladamente a população de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. São Paulo, 2006

Figura 6 - Análise da citometria de fluxo, com ilustração da fluorescência das células sangüíneas do gato pertencente ao grupo II, com infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e sem doença gengival grave. (A) A figura ilustra o citograma de todas as células da linhagem branca analisadas em uma amostra de sangue. Observa-se a população de linfócitos representada pelo “gate”. (B) A figura ilustra isoladamente a população de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. São Paulo, 2006

Figura 7 - Análise da citometria de fluxo, com ilustração da fluorescência das células sangüíneas do gato pertencente ao grupo III, sem infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e com doença gengival grau 3 ou 4. (A) A figura ilustra o citograma de todas as células da linhagem branca analisadas em uma amostra de sangue. Observa-se a população de linfócitos representada pelo “gate”. (B) A figura ilustra isoladamente a população de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. São Paulo, 2006

Figura 8 - Análise da citometria de fluxo, com ilustração da fluorescência das células sangüíneas do gato pertencente ao grupo IV, com infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e com doença gengival grau 3 ou 4. (A) A figura ilustra o citograma de todas as células da linhagem branca analisadas em uma amostra de sangue. Observa-se a população de linfócitos representada pelo “gate”. (B) A figura ilustra isoladamente a população de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. São Paulo, 2006

APÊNDICE C - Quadros (1 a 4) com descrição dos animais pertencentes em cada grupo de análise.

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo*	F	F	F	F	F	F	F	M	F	M
Idade aproximada	3 A	4 A	3 A	3 A	4 A	2 A	5 A	2 A	3 A	5 A
Raça**	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD
Hiperemia gengival	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Mobilidade dentária	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Úlcera Gengival	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Aumento de linfonodos	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Grau de Gengivite***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 1: Identificação dos felinos do grupo I (não infectados pelo FIV e sem sinais de gengivite), segundo o sexo, idade aproximada, raça, presença de hiperemia gengival, mobilidade dentária, úlcera gengival, aumento de linfonodos regionais e grau de gengivite, São Paulo, 2005

*M: macho, F: fêmea; ** SRD: sem raça definida; Graus de gengivite segundo Waters et al., 1993: de 0 a 4

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo*	M	F	M	F	F	F	M	F	F	M
Idade aproximada	3 A	4 A	3 A	2 A	3 A	5 A	2 A	3 A	4 A	5 ^a
Raça**	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD
Hiperemia gengival	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Mobilidade dentária	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Úlcera Gengival	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Aumento de linfonodos	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Grau de Gengivite***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Quadro 2: Identificação dos felinos do grupo II (infectados pelo FIV e sem sinais de gengivite), segundo o sexo, idade aproximada, raça, presença de hiperemia gengival, mobilidade dentária, úlcera gengival, aumento de linfonodos regionais e grau de gengivite, São Paulo, 2005

* M: macho, F: fêmea; ** SRD: sem raça definida; Graus de gengivite segundo Waters et al., 1993: de 0 a 4

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo*	F	F	F	F	F	F	M	M	M	M
Idade aproximada	3 A	5 A	2 A	4 A	5 A	1 A	1 A	2 A	1 A	1 A
Raça**	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	SRD	Siamês	SRD	Siamês	SRD
Hiperemia gengival	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Mobilidade dentária	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Úlcera Gengival	presente	ausente	ausente	presente	presente	presente	ausente	presente	ausente	presente
Aumento de linfonodos	presente	presente	ausente	presente	ausente	presente	ausente	presente	presente	presente
Grau de Gengivite**	3	4	3	3	3	4	3	4	3	4

Quadro 3: Identificação dos felinos do grupo III (não infectados pelo FIV e com sinais de gengivite), segundo o sexo, idade aproximada, raça, presença de hiperemia gengival, mobilidade dentária, úlcera gengival, aumento de linfonodos regionais e grau de gengivite, São Paulo, 2005

*M: macho, F: fêmea; ** SRD: sem raça definida; Graus de gengivite segundo Waters et al., 1993: de 0 a 4

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sexo*	M	M	M	M	M	F	F	M	F	F
Idade aproximada	2 A	4 A	6 A	3 A	4 A	5 A	3 A	2 A	1 A	3 A
Raça**	SRD	SRD	SRD	Siamês	SRD	SRD	Siamês	Siames	SRD	SRD
Hiperemia gengival	presente	presente	presente	presente	presente	presente	Presente	presente	presente	Presente
Mobilidade dentária	presente	presente	presente	presente	presente	ausente	Presente	presente	presente	Presente
Úlcera Gengival	presente	presente	presente	presente	Ausente	ausente	Presente	presente	presente	Presente
Aumento de linfonodos	presente	presente	presente	presente	presente	ausente	Presente	ausente	ausente	Presente
Grau de Gengivite***	3	4	4	4	3	4	4	3	3	4

Quadro 4: Identificação dos felinos do grupo IV (infectados pelo FIV e com sinais de gengivite), segundo o sexo, idade aproximada, raça, presença de hiperemia gengival, mobilidade dentária, úlcera gengival, aumento de linfonodos regionais e grau de gengivite, São Paulo, 2005

*M: macho, F: fêmea; ** SRD: sem raça definida; Graus de gengivite segundo Waters et al., 1993: de 0 a 4