

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

O CALICIVÍRUS NA ESTOMATITE CRÓNICA FELINA: ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ana Carolina Martins Fontes

Orientadores:

Prof. Doutor João Requicha

Prof.^a Doutora Maria dos Anjos Pires

Prof. Doutor Carlos Viegas



Vila Real, 2021

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**O CALICIVÍRUS NA ESTOMATITE
CRÓNICA FELINA: ESTUDO
IMUNOHISTOQUÍMICO**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ana Carolina Martins Fontes

Orientadores:

Prof. Doutor João Requiça

Prof.^a Doutora Maria dos Anjos Pires

Prof. Doutor Carlos Viegas

Vila Real, 2021

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Carolina Martins Fontes

Cartão de Cidadão: 15345926

Telemóvel: (+351) 918873828

Correio eletrónico: carolinafontes97@hotmail.com

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Título da Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária: O calicivírus na estomatite crónica felina: estudo imunohistoquímico

Orientadores: Professor Doutor João Filipe Requicha, Prof.^a Doutora Maria dos Anjos Pires, Prof. Doutor Carlos Viegas

Ano de conclusão: 2021

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal sob supervisão do meu orientador, bem como dos restantes diretores clínicos com que tive o privilégio de contactar. O conteúdo aqui apresentado é original e todas as fontes de informação consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia final. Declaro ainda que o presente trabalho não foi apresentado em nenhuma instituição para obtenção de qualquer grau académico, sendo exclusivamente apresentado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Vila Real, 2021

Agradecimentos

Este capítulo da minha vida, que agora termina, foi repleto de muitas alegrias, mas também com muitos sacrifícios e obstáculos, os quais jamais conseguiria ultrapassar sozinha.

Ao meu pai, que infelizmente já não está entre nós para presenciar a concretização deste objetivo e que foi incansável para tornar possível este sonho, obrigada por tudo, espero que estejas muito orgulhoso.

À minha mãe, que sempre me apoiou e compreendeu, sendo um alicerce fundamental para que eu seguisse em frente, nunca duvidando de mim.

Aos meus avós, Gracinda e Joaquim, que acompanharam este processo com o maior entusiasmo, por todo o mimo que sempre me deram e, em especial à minha avó Gracinda, por ser um exemplo de mulher e de ser humano, se dizem que as avós são mães duas vezes, então tu és a prova disso.

À minha irmã Laura, por todo o apoio neste caminho e por estar presente nos momentos em que eu não estive mantendo sempre a força e a garra.

A toda a minha restante família que sempre me apoiou e acompanhou.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), ao Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, em particular aos Prof. Doutor João Requicha, à Prof.^a Doutora Maria dos Anjos Pires e ao Prof. Doutor Carlos Viegas, pela dedicação, trabalho, simpatia e pela ajuda nos momentos mais complicados desta dissertação.

Ao professor Pedro Faísca e à DNATech por toda a colaboração e disponibilidade.

A todos os elementos das equipas do Hospital Veterinário da UTAD, do Hospital Veterinário de Leiria e do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, por me acolherem da melhor forma, por todos os ensinamentos, pela paciência e pela amizade, permitindo-me crescer todos os dias um bocadinho mais enquanto estudante de Medicina Veterinária e enquanto pessoa.

À Maria Vieira, minha colega de laboratório, incansável, por toda a ajuda e companheirismo e à Marcela Oliveira que, sem me conhecer, prontificou-se a ajudar na dissertação e empenhou-se como se fosse sua, fico feliz de ainda existirem pessoas boas.

A todos os meus colegas e amigos que partilharam comigo este caminho, todos sabemos que sozinhos é impossível. Às minhas amigas de todas horas Cátia, Gui, Maria Beatriz, Paula, Reppen e Rita, que merecem um louvor especial por me aturarem

diariamente. Ao Ramiro, por partilhar comigo toda a sua sabedoria, por todo o seu altruísmo e amizade. À Rufino, por toda a amizade e por me ajudar e guiar. Às minhas afilhadas Gui, Rita e Sofia, por toda a amizade e carinho.

Ao meu amigo de sempre João Antunes, por todo o carinho sempre e por acreditares em mim, pela tua amizade sólida e por seres um porto seguro, obrigada por todas as vezes que te liguei a chorar e terminei a rir e à minha amiga Rita Rolo, obrigada por toda amizade e companheirismo, por festejarem as minhas vitórias como vossas e por serem os meus maiores apoiantes nas fases mais difíceis.

Ao meu namorado João, por todo o carinho e paciência, por ser um porto de abrigo e à sua família por me acolher como uma dos seus, sem hesitar.

A todos os animais, em especial aos meus, por me mostrarem o amor incondicional.

A todos os que não referi, mas que não esqueço e que de alguma forma contribuíram para que esta etapa tenha sido tão incrível.

Obrigada!

Resumo

As doenças da cavidade oral são muito frequentes na clínica médica felina e apresentam quadros clínicos muito distintos ao exame estomatológico-dentário. A avaliação histológica é essencial na identificação e classificação das lesões, avaliação da arquitetura dos tecidos, na sua organização tecidual habitual e também a sua relação com os tecidos adjacentes, permitindo por isso o estudo dos detalhes morfológicos.

As condições inflamatórias da cavidade oral são muito frequentes nos gatos, realçando-se como mais comuns a gengivoestomatite crónica felina (GECF). A GECF é uma doença crónica imunomediada da cavidade oral, caracterizada por uma resposta inflamatória exagerada a um estímulo antigénico constante e que se traduz numa inflamação oral simétrica e bilateral dos tecidos orais. A sua etiologia multifatorial não é completamente conhecida, inclui fatores infecciosos, ambientais e sistémicos- A presença de placa bacteriana provoca uma estimulação do sistema imunitário, existindo ainda outros fatores infecciosos que podem contribuir para o desenvolvimento desta doença, de entre eles o Calicivírus Felino (CVF). O CVF é um agente patogénico muito contagioso e, por isso, amplamente distribuído pela população felina. As células *Natural Killer* (NK), linfócitos granulares do sistema imune inato, representam, em conjunto com outras células e fatores humorais, a primeira linha de defesa contra infeções virais.

Através da avaliação celular da mucosa oral de animais com GECF, e tendo como principais objetivos a identificação da presença do antigénio CVF e células NK, no sentido da melhor compreensão da afeção, integrou-se o estudo do papel do CVF na imunidade da cavidade oral.

Quarenta amostras de mucosa oral de gatos com diagnóstico de estomatite crónica felina foram alvo análise imunohistoquímica, após a otimização do protocolo indireto com polímero, para avaliação da expressão do antigénio CVF e identificação de células NK, positivas para CD56. As células imunopositivas foram avaliadas em cinco campos de grande ampliação (objetiva de 40x) e estimadas por dois observadores independentes.

Neste estudo, não se encontrou uma associação significativa entre a presença de CVF e os grupos etários (KW test, $p=0.322$), a raça (KW test, $p=0.283$) ou o sexo (KW test, $p=0.322$) dos gatos em estudo. Também na marcação das células NK, não se observou uma relação entre as mesmas variáveis: grupo etário (KW test, $p=0.726$), raça (KW test, $p=0.282$) ou sexo (KW test, $p=0.503$) e a quantidade de células positivas. Da mesma forma, não se evidenciou uma relação entre a presença do CVF e a população de células NK (MW test: $Z(U)=63$, $p<0.0001$, $R=9.9$), que apresentaram uma elevada quantidade, mesmo quando não se identificou a presença de CVF, o que sugere a existência de outros motivos para a presença destas células, as quais devem ser exploradas em trabalhos futuros

Através da sua contribuição para a caracterização histológica e imunológica da cavidade oral, bem como para o conhecimento dos mecanismos de inflamação e da sua etiologia, este estudo revelou-se importante, na medida em que compreender estes mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias que se direcionem quer aos agentes etiológicos quer aos processos inflamatórios envolvidos.

Palavras-chave: Gato, inflamação oral, estomatite crónica, calicivírus felino, imunohistoquímica, células *Natural Killer*.

Abstract

Oral cavity diseases are very frequent in feline practice and present many different pictures on dental and oral examination. Histological evaluation is essential in the identification and classification of the lesions and in the assessment of tissue's architecture, its usual organization and its relationship with adjacent tissues, thus allowing the study of morphological details.

Inflammatory conditions of the oral cavity are very common in cats, the most common being the feline gingivitis-stomatitis complex (FCGS) and the eosinophilic complex. FCGS is a chronic immune-mediated condition of the oral cavity, characterized by an exaggerated inflammatory response to a constant antigenic stimulus, causing a bilateral, symmetrical oral inflammation of oral tissues. It is a multifactorial disease and its aetiology is not completely known, including infectious, environmental and systemic factors. The presence of bacterial plaque causes a stimulation of the immune system, and there are other infectious factors that can contribute to the development of this disease, including the Feline Calicivirus (FCV). FCV is a very contagious pathogen and therefore widely distributed in the feline population. Natural killer cells, granular lymphocytes of the innate immune system, represent, together with other cells and humoral factors, the first line of defence against viral infections.

Through the cellular evaluation of the oral mucosa of animals with FCGS, and having as main objectives the identification of the presence of the FCV antigen and NK cells, in order to better understand the condition, was integrated the study of the role of the FVC in the immunity of the oral cavity.

Forty samples of oral mucosa from cats diagnosed with feline chronic stomatitis were subjected to immunohistochemical analysis, after optimization of the indirect polymer protocol, for evaluation of FCV antigen expression and identification of NK cells, positive for CD56. Immunopositive cells were evaluated in five high-magnification fields (40x objective) and estimated by two independent observers.

In this study no significant association between the age group (KW test, $p=0.322$), breed (KW test, $p=0.283$) or sex (KW test, $p=0.322$) of the cats and the presence of FCV was observed. Regarding NK cells, no significant association between the age (KW test, $p=0.726$), breed (KW test, $p=0.282$) or sex (KW test, $p=0.503$) of the cats and the number of positive cells was observed. Likewise, it was not found a relationship between the presence of FCV and the presence of NK cells (MW test: $Z(U)=63$, $p<0.0001$, $R=9.9$), that showed high expression, even when the presence of FCV was not observed, suggesting different causes for the presence of these cells, which can be explored in future works.

Through its contribution to the histological and immunological characterization of the oral cavity, as well as to the understanding of the mechanisms of inflammation and its aetiology, this study played an important role, as understanding these mechanisms is fundamental for the development of new therapies that address either the etiological agents or the inflammatory processes involved.

Keywords: Cat, oral inflammation, chronic gingivostomatitis, feline calicivirus, immunohistochemistry, Natural Killer cells.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice Geral	xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Gráficos	Erro! Marcador não definido.
Lista de Abreviaturas, Siglas, Acrónimos e Símbolos	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histologia da mucosa oral.....	1
1.2. Inflamação da cavidade oral	1
1.3. Gengivoestomatite crónica felina.....	3
1.4. Calicivírus felino.....	6
1.5. Resposta imune às infeções virais.....	9
1.6. Imunohistoquímica	16
1.7. Objetivos	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1. Amostras.....	19
2.2 Protocolo de imunohistoquímica.....	19
2.3. Avaliação da positividade	22
2.4. Análise estatística.....	23
2.5. Construção de um formulário de requisição de análise histopatológica e citológica	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Caracterização da amostra estudada.....	25
3.2. Avaliação da positividade para o CVF.....	26
3.3. Avaliação da população de células NK (CD56 ⁺)	28
3.4. Relação entre positividade ao CVF e a população de células NK	30
3.5. Proposta de requisição de análise histopatológica e citológica lesões da cavidade oral do gato.....	30
4. DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Índice de Figuras

Figura 1 - Aspeto histológico de uma gengivoestomatite crónica felina.....	4
Figura 2 - As etapas em replicação do vírus (RNA positivo).....	7
Figura 3 - Vias de imunidade adquirida para eliminação de vírus.....	14
Figura 4 - Vias de evasão viral à resposta imunitária.....	16
Figura 5 - Representação esquemática da técnica de imunohistoquímica pelo método indireto com polímero.....	17
Figura 6 - Contentor em que as lâminas foram sujeitas à recuperação antigénica no microondas.....	21
Figura 7 - Lâminas dispostas na câmara de incubação horizontal, cobertas com PBS...21	
Figura 8 - Lâminas em xilol, após coloração com Hematoxilina de Gill.....	22
Figura 9 - Utilização do ImageJ® na contabilização da imunorreatividade.....	23
Figura 10 - Caracterização da população da amostra: distribuição relativa segundo o sexo, o grupo etário e raça.....	25
Figura 11 - Distribuição do número de células FCV1-43+ de acordo com o grupo etário.....	26
Figura 12 - Distribuição do número de células FCV1-43+ de acordo com a raça.....	27
Figura 13 - Distribuição do número de células FCV1-43+ de acordo com o sexo.....	27
Figura 14 - Distribuição do número de células CD56+ de acordo com o grupo etário.....	28
Figura 15 - Distribuição do número de células CD56+ de acordo com a raça.....	29
Figura 16 - Distribuição do número de células CD56+ de acordo com o sexo.....	29
Figura 17 - Análise da relação da contagem de células FCV1-43+ e CD56+.....	30

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Dados dos anticorpos usados no procedimento experimental.....20

Lista de Abreviaturas, Siglas, Acrónimos e Símbolos

BSA – Albumina sérica bovina (do Inglês, *bovine serum albumin*)

GECF – Genvivostomatite crónica felina

CVF – Calicivírus Felino

LHAP – Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade (do Inglês, *major histocompatibility complex*)

NK – do Inglês, *Natural Killer*

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do Inglês, *polymerase chain reaction*)

SI – Sem informação

Tc – Linfócitos T citotóxicos

Th – Linfócitos T auxiliares ou helper

TLR – Recetor do tipo *toll-like*

TRAIL – Ligando induzido pelo fator de necrose tumoral relacionado com a apoptose (do inglês, *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)

UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

VIF – Vírus da imunodeficiência felina

VLeF – Vírus da leucemia felina

1. INTRODUÇÃO

As doenças da cavidade oral são muito frequentes na prática da Medicina Felina. Estas apresentam quadros clínicos muito distintos e podem causar anorexia, ptialismo e agressividade associados à dor e ao desconforto provocados (Harley et al., 2011).

O exame estomatológico-dentário metódico e sistemático é de extrema importância e deve iniciar-se pela observação da cabeça, avaliando alterações como assimetrias faciais, secreções orais, nasais e oculares e lesões nos lábios e região perioral. Segue-se o exame da cavidade oral que deve incluir a inspeção de todas as estruturas anatómicas, elaborando também um odontograma de forma a registrar as alterações observadas. Esta avaliação nem sempre é um procedimento de fácil execução, dependendo o seu sucesso da colaboração do tutor na contenção do animal e deste último que, por dor ou pelo seu temperamento, pode não tolerar a manipulação. Por conseguinte, deve recorrer-se à sedação ou à anestesia geral que permitem uma melhor inspeção da cavidade oral e também a execução dos exames complementares de diagnóstico necessários, com realce para o exame radiográfico intraoral (Bellows, 2010).

1.1. Histologia da mucosa oral

A mucosa oral é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado e sem infiltrado linfocitário intraepitelial. Abaixo do epitélio, encontra-se a lâmina própria, composta por tecido conjuntivo laxo com numerosos fibroblastos, pequenos capilares sanguíneos, linfáticos e ductos salivares. Nesta camada, encontram-se dispersos escassos linfócitos e mastócitos, sendo que os primeiros podem aglomerar-se, formando pequenos agregados subepiteliais (Harley *et al.*, 2003, Harley *et al.*, 2011). A submucosa é composta por tecido conjuntivo laxo com presença de quantidades variáveis de glândulas salivares menores, feixes de músculo estriado, vasos sanguíneos e linfáticos e ductos salivares (Harley *et al.*, 2003). Ao longo dos processos alveolares da maxila, mandíbula e osso incisivo, a mucosa é modificada para formar a gengiva (Liebich & König, 2004).

1.2. Inflamação da cavidade oral

A estomatite e a gengivite referem-se à inflamação da mucosa da cavidade oral e da gengiva, respetivamente. As lesões podem estar em diferentes estádios e são classificadas como máculas, pápulas, vesículas, erosões, abscessos, granulomas e úlceras. Essas lesões podem ser causadas por agentes infecciosos (vírus ou bactérias), agentes químicos, traumatismos

mecânicos ou térmicos ou ser a manifestação local de determinadas doenças sistêmicas (autoimunes, renais ou endócrinas). Quando presente de forma crônica e/ou exagerada, esta inflamação perde a sua função protetora, tornando-se num mecanismo agressor que, por sua vez, leva à lesão dos tecidos moles da cavidade oral (Diehl & Rosychuk, 1993; Lommer, 2013; Zachary, 2017).

A mucosa oral com inflamação ligeira apresenta uma hiperplasia epitelial e queratinização paraqueratótica ligeiras. Dependendo da causa da inflamação, pode apresentar um pequeno aumento do número de linfócitos intraepiteliais e neutrófilos dispersos, assim como um infiltrado perivascular e intersticial de várias células inflamatórias, nomeadamente plasmócitos, linfócitos, mastócitos e raros macrófagos na lâmina própria e na submucosa (Harley et al., 2011).

A mucosa oral com inflamação moderada apresenta uma hiperplasia epitelial moderada com áreas de degenerescência e/ou ulceração. Apresenta um número considerável de linfócitos intraepiteliais, intercalados com macrófagos e neutrófilos. A lâmina própria e submucosa apresentam infiltrado linfoplasmocitário considerável, interposto com neutrófilos e macrófagos, podendo estas células inflamatórias formar uma banda liquenoide. Na submucosa, as células inflamatórias dispõem-se frequentemente em redor das fibras musculares esqueléticas (Harley et al., 2011).

A mucosa oral com uma inflamação grave/severa caracteriza-se por grandes extensões de células em degenerescência, edema intraepidérmico e intercelular, ulceração e exsudação superficiais, com grande número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A lâmina própria e a submucosa apresentam um denso infiltrado inflamatório composto maioritariamente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. Pode ocorrer, em algumas áreas, a substituição da lâmina própria por tecido de granulação e detritos necróticos com maior ou menor presença de fibrina, dependendo da etiologia (Harley et al., 2011).

As lesões inflamatórias da cavidade oral devem ser alvo de estudo histopatológico. As duas técnicas de biópsia mais frequentemente realizadas na cavidade oral são a excisional e a incisional. A técnica de biópsia excisional utiliza-se na remoção completa de uma ou mais lesões, preferencialmente com margens cirúrgicas adequadas (1-2 cm em todas as direções da lesão), sendo uma técnica aplicada normalmente em lesões de dimensões reduzidas e em localizações anatómicas de fácil acesso, podendo ter também efeito terapêutico. A técnica de biópsia incisional utiliza-se na remoção de apenas uma porção da lesão, retirando-se um fragmento em forma de cunha ou elíptico, que deve incluir, não só uma área representativa da

lesão, como também uma área de tecido aparentemente saudável e é uma técnica utilizada em lesões muito extensas ou localizadas em áreas anatómicas de difícil acesso (Ehrhart & Withrow, 2013; Reiter & Gracis, 2018).

A técnica histológica permite, que os tecidos excisados possam ser sujeitos ao exame microscópico, permitindo o estudo dos detalhes celulares, avaliando a arquitetura dos tecidos, isto é, alterações da sua organização normal e também a sua relação com os tecidos adjacentes. A correta execução da técnica de biópsia e obtenção de amostras significativas de tecido têm uma grande influência na qualidade do diagnóstico histológico. Também a adequada fixação e preparação das mesmas desempenham um papel fundamental para o sucesso da obtenção de boas preparações histológicas (Bancroft & Gamble, 2002; Junqueira & Carneiro, 2008).

As condições inflamatórias da cavidade oral são muito frequentes nos gatos, destacando-se a gengivoestomatite crónica felina, o complexo do granuloma eosinofílico e os pólipos nasofaríngeos (Falcão *et al.*, 2020). Neste trabalho, demos destaque à primeira entidade nosológica referida.

1.3. Gengivoestomatite crónica felina

A gengivoestomatite crónica felina (GECF) é uma afeção crónica da cavidade oral caracterizada por uma resposta inflamatória exagerada a estímulos antigénicos constantes (Winer *et al.*, 2016). Estas lesões apresentam uma distribuição tipicamente bilateral na cavidade oral e surgem, com maior frequência, nos arcos glossopalatinos e na região mais caudal da cavidade oral, a estomatite caudal, e ao nível da gengiva e mucosa alveolar, a mucosite alveolar, surgindo ainda com menor frequência na base da língua, na região mais rostral da cavidade oral ou nas regiões da faringe, palato e lábios (Diehl & Rosychuk, 1993; Healey *et al.*, 2007; Rolim *et al.*, 2017).

Sob o ponto de vista histológico, a GECF é uma inflamação crónica (Figura 1) em que predomina o infiltrado linfoplasmocitário (Winer *et al.*, 2016). Caracteriza-se pela presença de um infiltrado de linfócitos T (CD3⁺), mais prevalentes no epitélio (intraepiteliais) e na submucosa e de linfócitos B (CD20⁺) no estroma subepitelial. É referida também a presença de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), bem como uma resposta imune desregulada (Arzi *et al.*, 2017). Trabalhos anteriores descrevem uma relevante presença de linfócitos T e B nos tecidos afetados (Torres, 2020; Vieira, 2021).

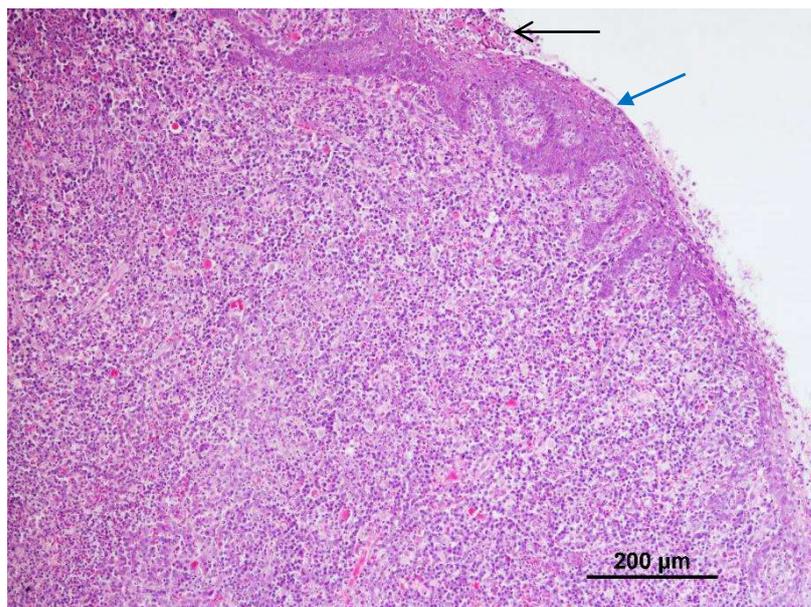


Figura 1 - Aspeto histológico de uma gengivoestomatite crónica felina. Observa-se erosão (seta azul) e úlcera (seta preta) com infiltrado linfoplasmocitário grave na lâmina própria e na submucosa. Hematoxilina e eosina.

A nível sanguíneo, são descritos níveis séricos mais elevados de linfócitos T citotóxicos em relação com os níveis de células T auxiliares ou *helper* ($CD4^+$), traduzindo-se numa baixa proporção da relação existente entre linfócitos T $CD4^+/CD8^+$, o que se coaduna com a presença de doenças desencadeadas por agentes intracelulares, como os vírus (Arzi *et al.*, 2017; Druet & Hennet, 2017; Winer *et al.*, 2016).

Em termos epidemiológicos, considera-se relevante a predisposição genética nas raças puras como o Persa, Siamês, Himalaia, Birmanês e Abissínio, pela expressão de formas mais graves da afeção, bem como na precocidade do aparecimento dos sinais clínicos, que podem manter-se o resto da vida. (Healey *et al.*, 2007; Lyon, 2005). Embora não esteja completamente definida uma predisposição sexual, alguns estudos reportam um maior número de casos em machos o que poderá estar relacionada com o comportamento mais agressivo, natural nos machos quando comparado com as fêmeas, o que aumenta a probabilidade de interação com agentes patogénicos (Dolieslager *et al.*, 2011).

A sua etiologia não é completamente conhecida, sabendo-se ser multifatorial, incluindo fatores infecciosos, ambientais e sistémicos (Catarino *et al.*, 2020; Harley *et al.*, 2011). A presença de placa bacteriana, ainda que em pequenas quantidades, provoca uma estimulação do sistema imunitário, existindo ainda outros fatores que contribuem para o desenvolvimento desta doença, como por exemplo a presença de agentes infecciosos como o Calicivírus Felino (CVF),

o Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF), o Vírus da Leucemia Felina (VLeF) e a *Bartonella henselae* (Greenfield, 2017).

Estudos recentes, apontam apenas o CVF como agente promotor de GECF, no entanto, a presença de outras infecções virais e/ou bacterianas têm influência no estado imunológico do animal, bem como na eficácia terapêutica e no prognóstico (Dowers *et al.*, 2010; Greenfield, 2017). Apesar da relação entre a doença e a infecção por CVF, não foi evidente uma associação entre a presença de RNA (ácido ribonucleico) de CVF nos tecidos e a localização ou extensão das lesões da mucosa (Dowers *et al.*, 2010), não tendo sido também demonstrado o papel definitivo do CVF na fisiopatologia da GECF (Knowles *et al.*, 1991; Vapniarsky *et al.*, 2020).

O diagnóstico de GECF baseia-se na observação dos sinais clínicos de inflamação da mucosa oral e na análise histopatológica destas lesões, sendo o diagnóstico precoce muito importante para se controlarem as manifestações clínicas mais graves da doença (Rolim *et al.*, 2017; Winer *et al.*, 2016). Para além da histopatologia, deve realizar-se a eletroforese das proteínas séricas (proteinograma) para evidenciação de hiperproteinemia por hipergamaglobulinemia (Hutchison & Johnston, 1998). As gamopatias policlonais, produzidas por estímulo de diferentes linfócitos B com progressão para estímulo de diferentes populações de plasmócitos, são a resposta imunitária normal a qualquer processo reativo ou inflamatório, estando habitualmente associadas a condições não neoplásicas (Lipsker & Thomas, 2019; O'Connell *et al.*, 2005). No sangue de animais doentes, verifica-se também o aumento das concentrações séricas de imunoglobulinas (Ig) G, M e A e de citocinas, revelando uma resposta à agressão por agentes infecciosos como bactérias, fungos e vírus. Quando a resposta imune é insuficiente para neutralizar os antigénios, esta persiste e promove um quadro de inflamação crónica (Lommer, 2013; Niza *et al.*, 2004). No sentido de identificar a presença de outras comorbilidades inflamatórias, é importante a realização da análise hematológica que deve incluir a bioquímica sérica e o hemograma (Niza *et al.*, 2004).

De modo a confirmar a presença de determinados vírus, pode ser realizada a pesquisa do antigénio através de diferentes metodologias como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês, *polymerase chain reaction*) ou técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e a pesquisa de anticorpos sanguíneos através de testes serológicos, como o ELISA (do Inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou o EIA (do Inglês, *enzyme immunoassay*) (Camy, 2003).

1.4. Calicivírus felino

1.4.1. Características

O Calicivírus Felino (FCV) pertence ao género *Vesivírus* da família *Caliciviridae* e é um agente patogénico muito contagioso, encontrando-se, por isso, amplamente distribuído pela população felina. O genoma do vírus, composto por RNA de cadeia simples e polaridade positiva, é pequeno, o que permite a sua rápida replicação. O CVF é um vírus sem invólucro e com uma cápside formada por uma proteína única, sendo a sua superfície a região de maior variabilidade e, assim, o principal alvo do sistema imunitário do hospedeiro (Geissler *et al.*, 2002). Apesar da variabilidade, existem semelhanças suficientes entre as estirpes para ser classificado como um único serotipo (Povey & Ingersoll, 1975), no entanto as diferenças que existem entre as variantes, constituem uma barreira na maximização da proteção cruzada da eficácia vacinal (Radford *et al.*, 2009).

1.4.2. Replicação viral

Os calicivírus infetam as células através de ligações mediadas por recetores e endocitose mediada por latrina, processo-chave no transporte de vesículas de uma vasta gama de moléculas da superfície para o interior da célula (Kaksonen & Roux, 2018). A sua replicação ocorre na superfície de vesículas membranosas no citoplasma das células infetadas, conforme representado na Figura 2 (Kaiser *et al.*, 2006).

Após a entrada no indivíduo, o CVF replica-se, de imediato, em diferentes tipos de células provocando alterações celulares e tecidulares como consequência da apoptose que induz nas células infetadas (Bhella *et al.*, 2008).

A replicação do vírus inicia-se após a libertação do genoma no citoplasma, sendo o RNA genómico viral reconhecido pelos ribossomas como um mRNA. O RNA subgenómico pode funcionar como um mecanismo de controlo do nível de tradução das proteínas estruturais (Maclachlan & Dubovi, 2017).

Os viriões acumulam-se no citoplasma associados ao citoesqueleto celular, quer dispersos como inclusões paracristalinas quer como inclusões lineares características (Maclachlan & Dubovi, 2017).

O calicivírus não têm um método definido de saída da célula e são libertados através da lise celular, presumivelmente após a necrose ou apoptose de células infetadas (Maclachlan & Dubovi, 2017).

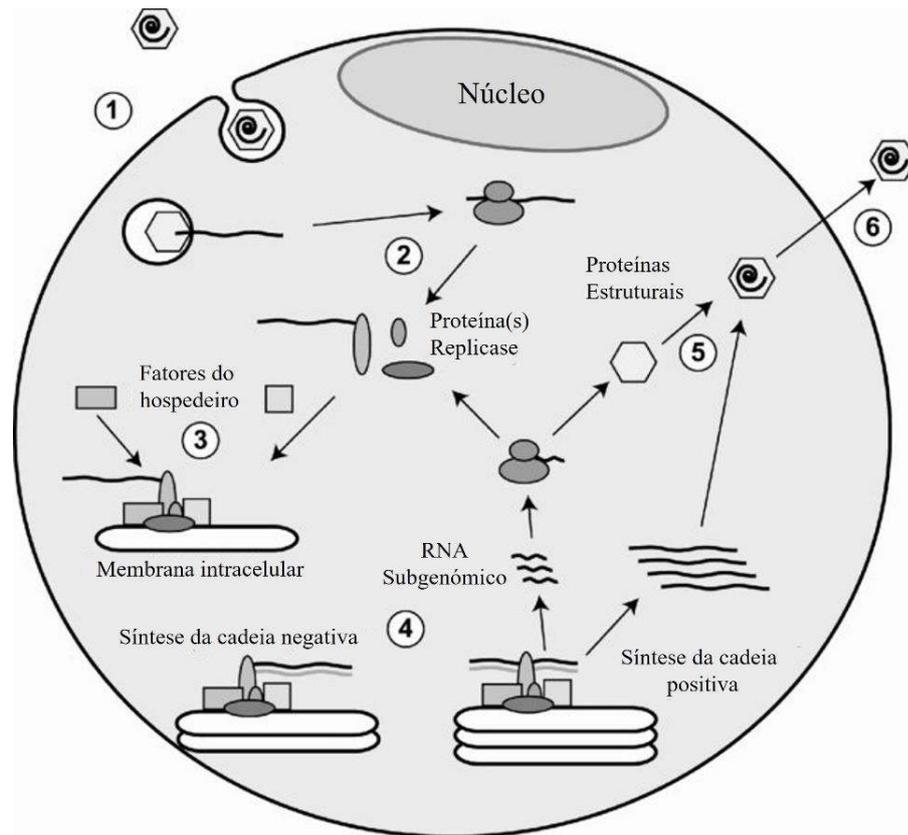


Figura 2 - As etapas em replicação do vírus (RNA positivo). 1 - Entrada e saída do viriônio; 2 - Tradução do genoma viral; 3 - Montagem do complexo de replicação viral; 4 - Maturação do complexo de replicação, replicação do RNA e síntese de RNA subgenômico; 5 - Montagem do viriônio e encapsidação; 6 - Saída do viriônio. Adaptado de Weeks & Brewery (2018).

1.4.3. Sinais clínicos da infecção por CVF

Os sinais clínicos resultantes da infecção por CVF dependem da virulência da estirpe infectante, da idade e das condições de vida do animal infectado. Os fatores de risco associados à eliminação do CVF incluem a convivência com múltiplos gatos, a gengivoestomatite crônica, a idade mais jovem ou o facto do animal não ser castrado (Afonso *et al.*, 2017). Embora ocorram infecções subclínicas, a maioria dos quadros clínicos enquadram ulceração oral, espirros e rinorreia serosa, após um período de incubação de 2 a 10 dias. Estas manifestações podem ser acompanhadas de anorexia ou sialorreia, devido à erosão da mucosa oral. Podem também surgir sinais de doença aguda do trato respiratório superior e, em quadros mais graves, pode ocorrer pneumonia, traduzindo-se num quadro de dispneia, tosse, febre e apatia, mais frequentes em animais mais jovens (Maclachlan & Dubovi, 2017).

1.4.4. Patogênese da infecção por CVF

A infecção ocorre via nasal, oral ou conjuntival, sendo a orofaringe o local primário de replicação viral. Dá-se então uma fase transitória de viremia, durante três a quatro dias após a infecção, em que o vírus se torna detetável noutros tecidos. A excreção das partículas virais dá-se também maioritariamente através das secreções orais e nasais, durante a fase aguda da infecção. A fase de regressão da infecção ocorre num período de duas a três semanas após a fase aguda (Radford *et al.*, 2009).

Após a regressão da fase aguda da doença, a maioria dos gatos resolve a infecção em aproximadamente 30 dias, sendo que alguns podem continuar a excretar o vírus indefinidamente. Sabe-se que um dos locais de armazenamento do vírus, em animais portadores e sem sinais de doença, é o epitélio tonsilar. Dado que a tonsilectomia não cessa o estado de portador, pensa-se existirem outros locais de armazenamento viral (Radford *et al.*, 2009). Uma pequena quantidade de gatos é resistente à infecção, provavelmente devido a fatores relacionados com a estirpe viral ou a características do próprio hospedeiro (Radford *et al.*, 2009).

1.4.5. Diagnóstico da infecção por CVF

O diagnóstico presuntivo é baseado na apresentação clínica. O diagnóstico definitivo é baseado no isolamento do vírus em cultura de células ou identificação de ácidos nucleicos virais por RT-PCR (do Inglês, *real time - polymerase chain reaction*) (Maclachlan & Dubovi, 2017). A sensibilidade deste método de diagnóstico depende dos *primers* utilizados na reação, bem como das estirpes do vírus. Uma vez que existe uma grande variedade de estirpes, deve ser utilizado um amplo painel para pesquisa de diferentes estirpes, de modo a minimizar a possibilidade de resultados falsos negativos. O vírus pode ser isolado de esfregaços nasais, conjuntivais e orofaríngeos, mas o isolamento do vírus pode falhar devido ao pequeno número de viriões infecciosos na amostra, à inativação do vírus durante o trânsito ou à presença de anticorpos na amostra que neutralizam o vírus *in vitro* (Radford *et al.*, 2009).

A identificação de antigénios virais nos tecidos dos animais afetados efetua-se através das técnicas de imunofluorescência ou de imunohistoquímica (Maclachlan & Dubovi, 2017). A técnica de IHQ foi desenvolvida para a identificação de CVF em culturas, e tecidos ou células fixados em formalina e embebidos em parafina. Esta técnica, que se demonstra ser muito eficaz, usa anticorpos mono ou policlonais, podendo utilizar avidina, biotina ou peroxidase, e a ampliação da marcação com polímeros, comercialmente disponíveis (Pires *et al.*, 2010).

Quando as condições são otimizadas, incluindo as de recuperação antigénica que podem ser efetuadas pelo calor, por enzimas ou pela conjugação de ambas, esta técnica permite a identificação de calicivírus nos tecidos. Aplicada a tecidos de gatos na fase aguda da doença, a IHQ identifica as células que contêm os CVF (Dick & Johnson, 1989).

1.5.Resposta imune às infeções virais

1.5.1. Viriões

As partículas de vírus, chamadas de viriões, consistem, como já descrito, num núcleo de ácido nucleico rodeado por uma camada de proteínas. Essa camada de proteínas, denominada por cápside, é composta por subcomponentes denominados capsómeros. Todas as proteínas do vírus funcionam como antigénio, estimulando o sistema imunitário do hospedeiro a produzir anticorpos protetores, as IgG. Os anticorpos contra os componentes da nucleoproteína em geral não são protetores, mas podem ser úteis para o diagnóstico sorológico (Burton, 1985; Tizard, 2018).

1.5.2. Imunidade inata

Muitas infeções virais são limitadas por respostas imunes inatas, rápidas e fortes. Vários intervenientes participam nesta resposta, como os componentes humorais, tais como os interferões, especialmente importantes neste processo, as lisozimas que têm capacidade de destruição de alguns vírus, as lectinas do tipo C que se ligam às glicoproteínas virais e bloqueiam a interação do vírus com as células hospedeiras, e as defensinas de leucócitos e de células epiteliais da mucosa que desempenham um papel duplo nas defesas antivirais, uma vez que podem atuar tanto no vírus como na célula hospedeira. Algumas defensinas podem bloquear as vias de sinalização intracelular nas células infetadas e interferir na transcrição do RNA viral. As células invadidas por vírus podem ainda sofrer apoptose prematura, impedindo que a invasão e a replicação viral sejam bem sucedidas (Jones *et al.*, 2019).

1.5.2.1. Recetores de reconhecimento de padrões (PRR)

Os vírus, ao contrário das bactérias e dos fungos, não contêm estruturas específicas facilmente reconhecíveis pelo sistema imunitário, uma vez que são construídos a partir de componentes derivados do hospedeiro. Por esse motivo, o sistema imunitário desenvolveu a capacidade de reconhecer os únicos componentes específicos do vírus, os seus ácidos nucleicos. Famílias de recetores de reconhecimento de padrões identificam os ácidos nucleicos virais. Um

desses recetores é o do tipo *toll-like* (TLRs), sendo que alguns [ex.: TLR7, TLR8 e RIG-1 (do Inglês, *retinoic acid-inducible gene-I-like receptor*)] reconhecem os vírus de RNA de molécula simples (Tizard, 2018).

As células dendríticas plasmocitóide usam uma via de sinalização especializada que liga aos TLRs (TLR7 e TLR9), iniciando a produção de grandes quantidades de interferões do tipo I (Jones *et al.*, 2019).

1.5.2.2. Interferões

Os interferões protegem as células contra a invasão viral, bacteriana e parasitária (protozoários). São glicoproteínas classificadas em três tipos: I, II e III. Os interferões do tipo I incluem formas múltiplas de IFN- α e IFN- β . O IFN- α é produzido em grandes quantidades por células dendríticas e, em quantidades menores, por linfócitos, monócitos e macrófagos. O IFN- β pode ser produzido por quase todas as células infetadas por vírus. Existe apenas um interferão tipo II, o IFN- γ , produzido por linfócitos T auxiliares/*helper* (Th, CD4⁺) do tipo 1, estimuladas por antígenos e por macrófagos (Peñaflor-Téllez *et al.*, 2019; Tizard, 2018).

Os dois principais interferões do tipo I (IFN- α e IFN- β) são produzidos algumas horas após invasão viral e em altas concentrações muito antes do desenvolvimento da imunidade adquirida. Estes são produzidos quando os ácidos nucleicos virais se ligam aos recetores TLR7, TLR9 e ao RIG, atrás referidos. Ambos se ligam a recetores das células próximas e ativam vias de sinalização que ativam alguns genes, muitos dos quais que codificam proteínas antivirais. O resultado é o desenvolvimento de um “estado antiviral”, em poucos minutos, e que atinge o seu pico em 5 a 8 horas após a infecção por estes agentes (Peñaflor-Téllez *et al.*, 2019).

Os genes estimulados por IFN atuam através de diferentes vias e têm diversos efeitos sobre os vírus. Alguns inibem amplamente o crescimento viral, enquanto outros têm como alvo vírus específicos. Atuam ainda em diferentes estágios de replicação, como a entrada do vírus, a remoção do envelope, a replicação do genoma, a montagem das proteínas ou a libertação dos viriões. Os interferões atuam também nas células, promovendo a eliminação viral e induzindo a apoptose. A existência de diversas isoformas de IFN- α indica que possuem diferentes papéis funcionais, incluindo aumento da sobrevivência de neutrófilos, ativação de macrófagos e regulação de células NK (do Inglês, *natural killer*), células dendríticas, células B, células T citotóxicas (Tc, CD8⁺) e células Th. Todos estes mecanismos são inatos e de ação antiviral de amplo espectro (Jones *et al.*, 2019).

A capacidade das células produzirem interferões varia, sendo que quase todas as células infectadas podem produzir IFN- β . As células T estimuladas por antígenos são a principal fonte de IFN- γ (Peñaflor-Téllez *et al.*, 2019).

O IFN- α tem uma ação sobre a maioria das outras populações celulares do sistema imunológico. Resumidamente, estimula a diferenciação dos monócitos em células dendríticas, bem como a sua maturação e atividade; estimula a proliferação de células T de memória e ativa células T *naïve*, em doenças virais crônicas; promove a produção de IgG pelos plasmócitos e aumenta a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do Inglês, *major histocompatibility complex*) (Tizard, 2018).

1.5.2.3. Células Natural Killer

Após reconhecida a entrada do vírus no hospedeiro pelas células do sistema imune inato, para além da sua inibição através da libertação de interferões do tipo I (IFN- α e IFN- β), descrita anteriormente, há uma ação lítica direta desencadeada pelas células NK, sobre as células infectadas (Arosa *et al.*, 2012; Hammer *et al.*, 2018).

As células NK são linfócitos grandes, granulares, integrantes do sistema imune inato e representam a primeira linha de defesa contra células tumorais e infeções virais (Lodden & Lanier, 2006; Vivier *et al.*, 2008). Estas têm vários mecanismos para eliminar células infectadas por vírus, nomeadamente através de ativação dos recetores de morte extracelular das células infectadas e também através da exocitose dos seus grânulos citolíticos (Smyth *et al.*, 2005). Para mediar a citólise através de recetores de morte, as células NK expressam vários ligandos extracelulares, incluindo o FasL (do Inglês, *fas ligand*) e o TRAIL (do Inglês, *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Wiley *et al.*, 1995), que ao interagir com os recetores de morte expressos nas células-alvo resultam na apoptose destas (Van Erp *et al.*, 2019).

Os linfócitos NK podem também induzir a citotoxicidade através da libertação de grânulos citolíticos armazenados, nomeadamente, as perforinas (glicoproteínas formadoras de poros na superfície das células alvo) e as granzimas (enzimas que constituem um grupo diverso de proteases) que entram na célula-alvo e desencadeiam a apoptose através das vias de sinalização mediadas pelas caspases, proteases que promovem a clivagem de outras proteínas em cascata resultando na morte celular por apoptose (Smyth *et al.*, 2005). A resposta antiviral das células NK é também mediada pela libertação de uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias com atividade antiviral, como a interleucina-1 β , a interleucina-6, o IFN- γ e o TNF- α (Miller, 2002; Neto *et al.*, 2018). Através das suas citocinas, as células NK têm ainda a

capacidade de modular a resposta inflamatória mediada pelos linfócitos T (nomeadamente os linfócitos Th e os linfócitos Tc), uma vez que o IFN- γ , é o responsável pelo aumento da expressão de moléculas de MHC classe I e classe II em células apresentadoras de antígeno, levando a um aumento da apresentação de antígenos aos linfócitos T, ativando-os. Esta molécula regula ainda a atividade dos macrófagos que ficam ativados na sua presença. Deste modo as citocinas produzidas pelos linfócitos NK ao longo das fases iniciais de uma resposta imunológica têm a capacidade de direcionar o tipo de resposta imune (Di Vito *et al.*, 2019; Gattenlöhner *et al.*, 2009; Leshchyn's'ka & Sytnyk, 2015; Van Erp *et al.*, 2019). Além disso, as células NK intervêm também na citotoxicidade direta mediada por anticorpos, nomeadamente pelas IgG (van Erp *et al.*, 2019).

A ativação das células NK é regulada por um equilíbrio na ativação dos seus recetores ativadores e inibidores, conciliando-se também com a presença de certas citocinas (Pegram *et al.*, 2011). As células saudáveis inibem a ativação dos linfócitos NK, por meio da expressão de MHC-I que interage com os recetores inibitórios na superfície das células NK e que incluem os recetores do tipo imunoglobulina (KIRs, do Inglês, *killer-cell immunoglobulin-like receptors*) e os recetores do tipo imunoglobulina dos leucócitos (LILR, do Inglês, *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) (Pegram *et al.*, 2011). Esta sinalização mediada por recetores inibitórios é essencial para controlar a atividade das NK, neutralizando a sinalização de ativação e, assim, evitando a atividade excessiva destas células.

Alguns vírus têm a capacidade de diminuir a expressão de MHC-I na superfície das células, interferindo na apresentação de antígenos virais, escapando assim à identificação pelo sistema imune adaptativo (Früh *et al.*, 1999). Embora essa estratégia de evasão seja eficaz na prevenção do reconhecimento por células T, a expressão diminuída de MHC-I promove o reconhecimento e a eliminação de células-alvo infetadas por vírus pelas células NK (Kärre *et al.*, 1986).

Os recetores de ativação que são expressos pelas células NK facilitam a ativação e identificação de ligandos virais ou induzidos por *stress*, presentes nas células alvo (alguns recetores naturais de citotoxicidade ligam-se a glicoproteínas virais permitindo a ativação de células NK após a deteção de células infetadas) (Arnon *et al.*, 2001; Mandelboim *et al.*, 2001).

1.5.3. Imunidade adquirida

1.5.3.1. Imunidade mediada por anticorpos

Os anticorpos antivirais podem prevenir a invasão celular, bloqueando a adesão dos viriões às células alvo, estimulando a fagocitose do vírus por opsonização, desencadeando a virólise mediada pelo complemento (via clássica) ou causando agregação viral e, assim, reduzindo o número de unidades infecciosas disponíveis para a invasão celular. A ligação de anticorpos por si só não destrói os vírus, uma vez que a divisão dos complexos imunes vírus-anticorpo liberta viriões infecciosos (Jones *et al.*, 2019) (Figura 3).

Os anticorpos não são apenas dirigidos contra as proteínas dos viriões, mas também contra as proteínas virais expressas na superfície das células infetadas e assim essas células são também destruídas. Os anticorpos medeiam a morte de células infetadas usando o complemento ou a citotoxicidade mediada por células, dependentes de anticorpos (ADCC). As células com atividade citotóxica incluem as NK, os macrófagos e os neutrófilos que possuem recetores Fc (recetores para o fragmento cristalizável, parte constante das Ig) que se ligam às células-alvo revestidas de anticorpos. Os anticorpos neutralizantes de vírus incluem as IgG e a IgM no soro e a IgA nas secreções e superfícies mucosas (Tizard, 2018) (Figura 3).

1.5.3.2. Imunidade mediada por células

Embora os anticorpos e o complemento possam neutralizar os viriões livres e também mediar a destruição das células infetadas por vírus, as respostas imunes mediadas por células são muito mais eficazes no controlo de doenças virais (Jones *et al.*, 2019).

Os antígenos virais podem ser expressos em células infetadas muito antes das réplicas virais serem produzidas. Quando esse antígeno endógeno é apresentado por moléculas do MHC classe I, às células Tc, as células infetadas são reconhecidas como estranhas e destruídas (Tizard, 2018) (Figura 3).

Em algumas circunstâncias, as células T citotóxicas podem destruir os vírus intracelulares sem eliminar as células hospedeiras. Este efeito é mediado pelo IFN- γ , produzido pelas células T, e pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzido maioritariamente pelos macrófagos. Estas citocinas ativam duas vias viricidas distintas, uma que atua eliminando as partículas da nucleocápside viral, incluindo o genoma que contém, e a segunda via que atua destabilizando o RNA viral (Jones *et al.*, 2019) (Figura 3).

Os anticorpos antivirais anti-CVF podem persistir por mais de quatro anos na ausência do vírus e os anticorpos maternos têm uma semivida de 15 dias, diminuindo progressivamente

entre as 8 e as 14 semanas. Alguns animais são suscetíveis à infecção a partir das seis semanas de idade enquanto outros se mantêm protegidos até aos seis meses. A constante estimulação antigénica leva a uma manutenção dos títulos de anticorpos. Por outro lado, as células T citotóxicas morrem logo após a eliminação do vírus, mas persistem as células T de memória por muitos anos (Carvalho, 2020; Dawson *et al.*, 2001), sendo reativadas rapidamente numa nova entrada do antígeno (Figura 3).

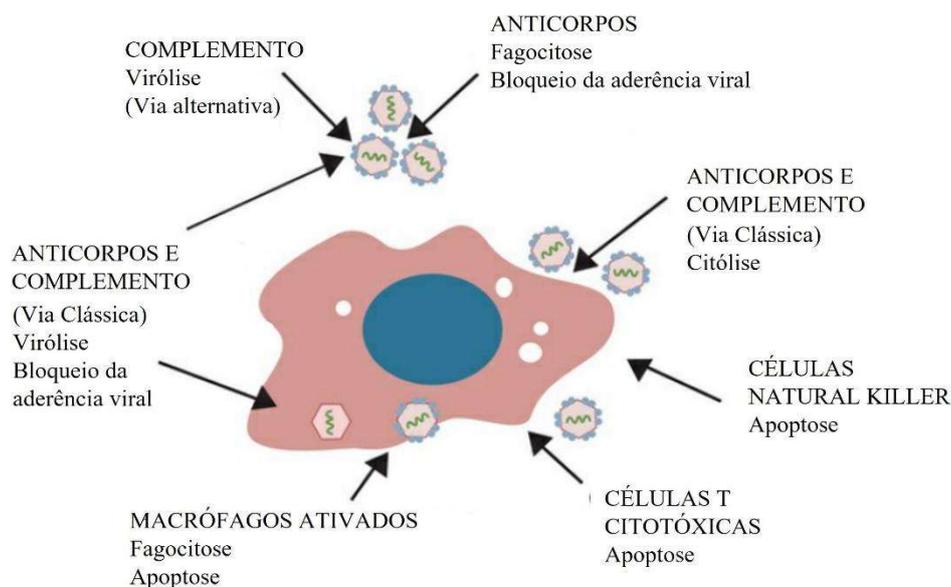


Figura 3 - Vias de imunidade adquirida para eliminação de vírus: fagocitose por anticorpos e macrófagos ativados; citólise por anticorpos e complemento; apoptose por células NK, células T citotóxicas e macrófagos ativados; virólise por anticorpos e complemento e bloqueio da aderência viral por anticorpos (através da opsonização) e complemento. Adaptado de Tizard (2018).

1.5.4. Evasão à resposta imune

Os vírus RNA têm um genoma muito pequeno, com pouco espaço para genes específicos para suprimir a defesa do hospedeiro. Como resultado, estes vírus têm, na variação antigénica, o seu principal mecanismo de evasão imunológica. Os vírus podem ainda bloquear a atividade do interferão, desde o bloqueio da transdução do sinal do recetor do interferão até à síntese de recetores do interferão solúveis (Tizard, 2018) (Figura 4).

1.5.4.1. Interferência com as vias de processamento dos antígenos

Muitos vírus interferem na expressão de moléculas de MHC-I e, portanto, inibem a apresentação de antígenos por esta via. Utilizam diferentes técnicas supressivas, incluindo a redução da transcrição de genes do MHC, o bloqueio da função da proteína transportadora e da

transferência de peptídeos para o retículo endoplasmático, inibindo a degradação no imunoproteossoma das proteínas virais, ou inibindo o transporte intracelular das cadeias α do MHC-I, destruindo estas moléculas e, conseqüentemente, impedindo a apresentação de MHC na superfície da célula (Jones *et al.*, 2019).

1.5.4.2. Evasão às células NK

As estratégias de evasão viral às células NK dividem-se em cinco mecanismos diferentes: (i) ligação de recetores inibitórios de classe I em células NK, por homólogos de MHC de classe I codificados pelo vírus; (ii) regulação da expressão de proteínas de classe I, induzidas pelo vírus, resultando na expressão seletiva ou regulação positiva dessas moléculas, que podem ligar-se a recetores inibidores de classe I de células NK; (iii) interferência com a função do recetor ativador de células NK, causada por inibição da expressão do ligando correspondente, da sua sinalização em células hospedeiras infetadas ou da produção de antagonistas, codificados por vírus; (iv) inibição da ativação das células NK, através da modulação viral de redes de citocinas codificadas pelo vírus que interferem com a função das células NK; (v) e efeitos inibitórios diretos dos vírus nas células NK, incluindo infecção de células NK e ligação de recetores inibitórios que não da classe I por proteínas do envelope viral (Orange *et al.*, 2002).

1.5.4.3. Evasão à resposta dos linfócitos B

A produção de níveis insuficientes de anticorpos neutralizantes ou a lentidão da sua produção permitem que a velocidade de disseminação dos vírus seja superior à da sua neutralização por estas moléculas (Tizard, 2018).

1.5.4.4. Evasão através de latência

No período de latência, os vírus expressam apenas um número mínimo de genes e não expressam antígenos não sendo, por isso, detetados pelo sistema imunológico, podendo permanecer nesse estado por muitos anos (Tizard, 2018). As respostas imunes durante o período de latência, embora incapazes de eliminar os vírus, podem prevenir o desenvolvimento de quadros clínicos e, portanto, têm um papel protetor. A imunossupressão ou o stresse podem permitir que a doença ocorra em período de latência. A associação entre o stresse e o desenvolvimento de algumas doenças virais é, assim, bem evidente (Tizard, 2018).

1.5.4.5. Inibição da apoptose

A apoptose é uma resposta celular protetora e, numa célula infetada, os vírus morrem quando a célula morre, sendo especialmente significativo se ocorrer antes da sua libertação (Peñaflor-Téllez *et al.*, 2019). A resposta imunológica aos vírus pode, por vezes, ser uma desvantagem na medida em que, em diversas infeções a gravidade da doença resulta de respostas imunológicas inadequadas ou excessivas (como uma tempestade) e não da ação direta do vírus (Tizard, 2018).

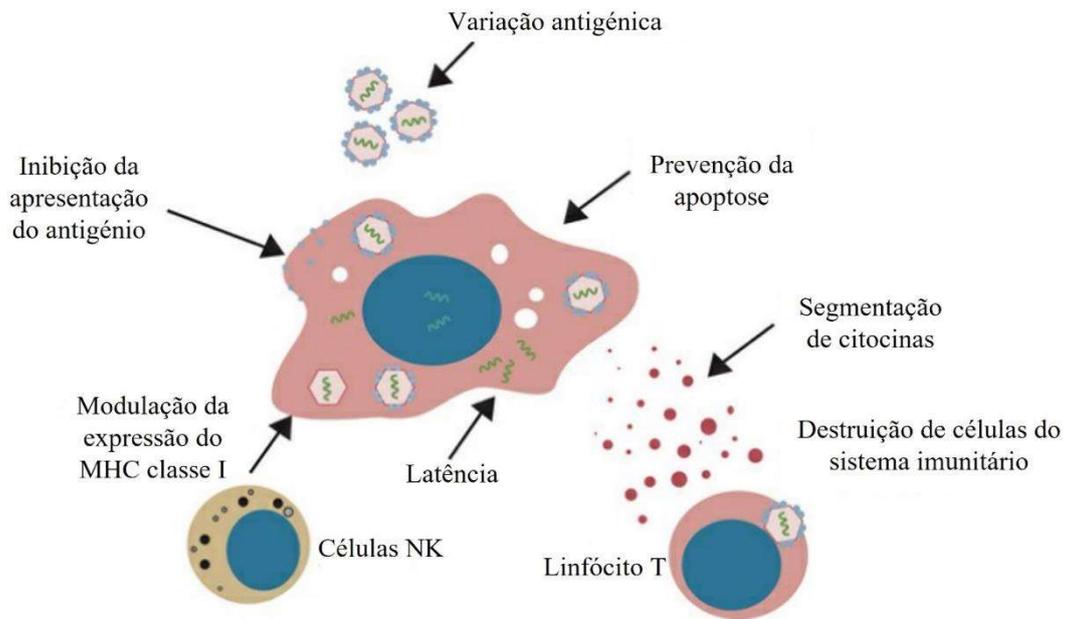


Figura 4 - Vias de evasão viral à resposta imunitária: modulação da expressão do MHC-I (interferindo com as vias de processamento dos antígenos, com a evasão às células NK); variação antigénica (através da formação de distintos antígenos mas intimamente relacionados, devido à regulação ineficaz das RNA polimerases); prevenção da apoptose (evitando a morte da célula infetada é evitada a morte do vírus); segmentação das citocinas (diminuindo a resposta pró-inflamatória); latência (expressando apenas um número mínimo de genes, sem expressão de antígenos virais, não sendo, por isso, detetados pelo sistema imunitário). Adaptado de Tizard (2018).

1.6. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica utilizada para complementar o diagnóstico anatomopatológico de doenças infecciosas, neoplásicas, de entre outras. Esta técnica laboratorial combina três grandes áreas: a imunologia, a histologia e a química. A IHQ permite identificar antígenos específicos em secções de tecido, a partir de anticorpos que identificam esses antígenos, com base nas interações antígeno-anticorpo, isto é, com a formação de um complexo imune. A posterior reação enzimática com um agente cromogénico, possibilita a

visualização das estruturas positivas com um microscópio ótico. A detecção do antígeno poderá ser feita a partir de dois métodos, o direto e método indireto (Ramos-Vara, 2005).

O método direto é o mais simples, ocorrendo numa só etapa. É utilizado somente um anticorpo (o primário) marcado, ou seja, o anticorpo que possui o marcador liga-se diretamente ao antígeno. No entanto, é uma técnica muito pouco sensível e com possibilidades de originar falsos positivos (Ferro, 2014). O método indireto, mais complexo, ocorre em várias etapas, o que permite não só a identificação de antígeno, mesmo presente em quantidades reduzidas, como também a obtenção de um sinal mais forte (Ramos-Vara, 2005).

Atualmente, os polímeros são utilizados em ambos os métodos, uma vez que permitem uma maior rapidez e sensibilidade, um sinal de amplificação mais forte e uma diminuição de fatores de erro, comparativamente a outras técnicas, tendo como desvantagem o custo, mais dispendioso (Ferro, 2014).

O método indireto com revelação por polímero inclui os seguintes passos: a desparafinação, a recuperação antigénica, a inativação das peroxidases endógenas, o bloqueio de ligação inespecífica, a incubação com o anticorpo primário, a incubação com o anticorpo secundário, a incubação com o polímero, a revelação pela 3,3'-diaminobenzidina, o contraste com a coloração pela hematoxilina, a desidratação e a montagem definitiva da lâmina com lamela (Figura 5) (Ramos-Vara, 2005). Os anticorpos secundários estão acoplados a um polímero e enzimas, como a peroxidase de rábano (HRP, do Inglês, *horseradish peroxidase*). O grande número de enzimas presentes no polímero, irá associar-se a uma maior quantidade de cromogénio que, ao precipitar, resulta numa marcação mais intensa, aumentando assim a sensibilidade do método (Ferro, 2014).

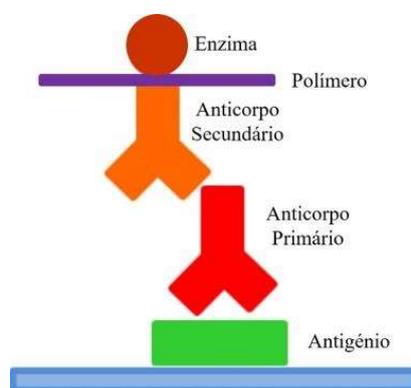


Figura 5 - Representação esquemática da técnica de imunohistoquímica pelo método indireto com polímero. Adaptado de Ferro (2014).

1.7.Objetivos

Foi objetivo principal deste trabalho, contribuir para a caracterização da composição imunológica da mucosa oral de animais com gengivoestomatite crónica felina.

Para o concretizar, objetivos adicionais foram a identificação da presença de antigénios de Calicivírus Felino (CVF) e a identificação de células *Natural Killer* (NK) nestas lesões, assim como a comparação entre a presença e quantidade destes antigénios e destas células inflamatórias.

Como objetivo clínico e complementar aos anteriores, a proposta de um modelo de uma ficha de requisição de análise, adaptado à recolha de amostras de medicina de cavidade oral.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

Este estudo foi realizado com base em 40 amostras de mucosa oral, de 40 gatos com prévio diagnóstico anatomopatológico de gengivoestomatite crónica, no período compreendido entre 2009 e 2018. Estas foram provenientes do arquivo do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD (LHAP-UTAD) e do Laboratório DNATech de Lisboa, gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Pedro Faísca.

Estas amostras foram acompanhadas com dados clínicos sobre a idade, a raça e o sexo.

2.2 Protocolo de imunohistoquímica

As amostras de biópsia da mucosa oral, previamente fixadas em formaldeído tamponado, embebidas em parafina, foram seccionadas no micrómetro obtendo cortes com espessura de 3 μm em lâminas adesivadas.

As lâminas foram desparafinadas em xilol durante 15 minutos, seguidas da hidratação em álcoois com percentagens decrescentes de concentração durante 10 minutos cada (100°-95°-80°-70°) e, por fim, lavadas em água destilada.

As amostras foram seguidamente submetidas à recuperação antigénica, com tratamento térmico, imersos em 250 mL de solução de tampão citrato (pH 6 \pm 0,2), durante 3 ciclos de 5 minutos cada, em micro-ondas a 750W (Figura 6). Entre os diferentes ciclos, verificou-se se os cortes continuavam imersos na solução, de modo a prevenir a secagem dos mesmos, com adição de água destilada, caso necessário.

Após este tratamento, decorreu o arrefecimento à temperatura ambiente, no mesmo tampão citrato, durante aproximadamente 20 minutos. Seguiu-se a inibição das peroxidases endógenas, com imersão dos cortes em peróxido de hidrogénio a 3%, durante 30 minutos.

As lâminas foram, de seguida, colocadas em câmara de incubação horizontal e, após lavagem com PBS, teve lugar a incubação com o soro normal universal (*Protein Block, Novolink Max Polymer, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido*), durante 5 minutos. Este passo tem como finalidade a redução da marcação inespecífica.

Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário (previamente diluído em BSA, do Inglês, *bovine serum albumin*, a 5%), CD56 (Monoclonal Antibody anti Human CD56, clone 123C3, Dako Cytomation, Estados Unidos da América) com diluição 1:200, para a

identificação de células NK, e com o anticorpo anti-FCV1-43 43 (Mouse monoclonal de Calicivírus Felino, clone ab33990, Abcam, Reino Unido) com diluição 1:50, para a identificação de calicivírus, no frigorífico a 4°C, durante a noite (Tabela 1).

Seguidamente, e depois de lavagem com PBS, decorreu a incubação com soro Post Primary Block (Novolink Max Polymer, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido), durante 30 minutos, após o que foi de novo feita a lavagem com PBS (Figura 7). Após esta lavagem feita incubação com o soro Novolink Polymer (Novolink Max Polymer, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido), durante 30 minutos. Terminado este tempo, realizou-se a última lavagem em PBS. Posteriormente a este passo, seguiu-se a revelação com o agente cromogénico, a 3,3'-diaminobenzidina, (DAB chromogen *Novolink Polymer Detection System Novocastra*, Reino Unido), durante 10 minutos, e lavagem em água corrente durante 10 minutos.

Tabela 1 - Dados dos anticorpos usados no procedimento experimental.

Anticorpo primário	Tempo de incubação	Diluição	Clone	Recuperação antigénica
CD56	Durante a noite	1:200	123C3 (DakoCytomation)	Tampão citrato/750W Micro-ondas: 5 minutos, 3 ciclos
FCV1-43	Durante a noite	1:50	ab33990 (Abcam)	Tampão citrato/750W Micro-ondas: 5 minutos, 3 ciclos

Como controlo positivo para a identificação de linfócitos *natural killer* (NK), foi utilizada uma amostra de linfonodo e, como controlo negativo, o mesmo linfonodo, mas utilizando a técnica sem adição do anticorpo primário (substituído por BSA a 5%). Em todas do procedimento experimental foram incluídos estes controlos.

Como controlo positivo para a identificação do Calicivírus Felino (CVF), foi utilizada uma amostra de mucosa oral de um animal positivo à pesquisa de antígeno de CVF pela técnica de PCR e como controlo negativo a mesma amostra, mas utilizando a técnica sem adição do anticorpo primário (substituído por BSA a 5%). Em todas do procedimento experimental foram incluídos estes controlos.

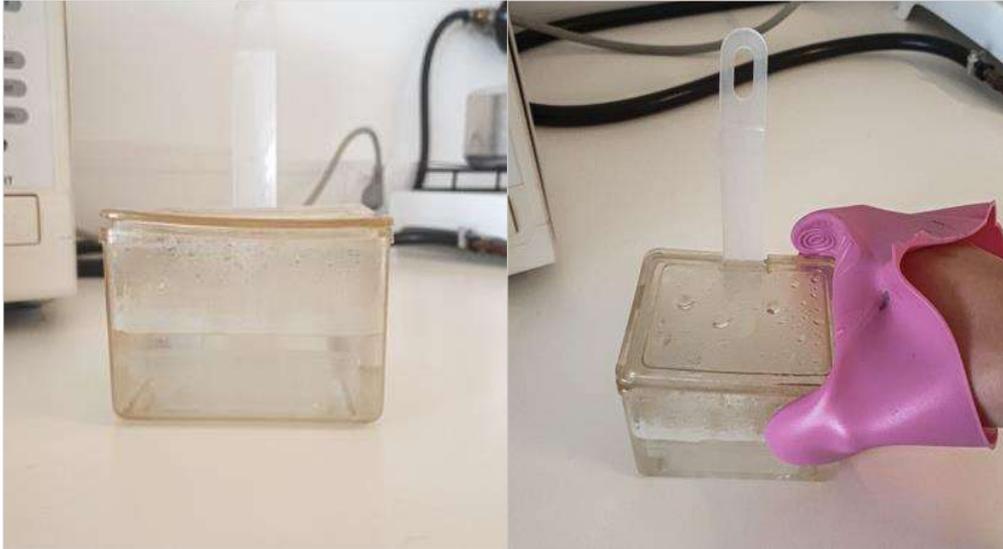


Figura 6 - Contentor em que as lâminas foram sujeitas à recuperação antigénica no micro-ondas.



Figura 7 - Lâminas dispostas na câmara de incubação horizontal, cobertas com PBS.

O contraste nuclear foi realizado com recurso à coloração com hematoxilina de Gill, durante 3 minutos e lavagem em água corrente tépida durante 10 minutos. Por fim, procedeu-se a desidratação das lâminas em álcoois com percentagens crescentes de concentração durante

5 minutos cada (70°-80°-95°-100°) e diafanização em xilol durante 15 minutos (Figura 8), com vista à realização da montagem definitiva das lâminas em Entellan®.

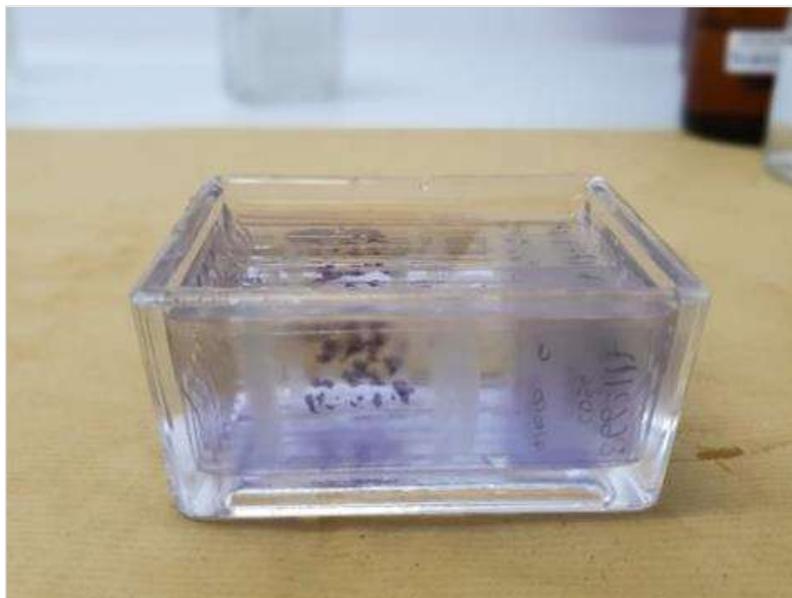


Figura 8 - Lâminas em xilol, após coloração com Hematoxilina de Gill.

2.3. Avaliação da positividade

Para ambos os marcadores, as células que apresentavam cor castanha do seu citoplasma e/ou membrana citoplasmática foram consideradas positivas.

Em cada caso foram realizadas cinco fotografias, dos campos com maior número de células marcadas, em microscópio Nikon E-600 com objetiva de 40x, a aquisição de imagem, com o programa NIS elements D (Nikon, Japão). A avaliação e contabilidade das células positivas em todas as imagens e, para ambos os anticorpos, foi efetuada com recurso ao software ImageJ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (Figura 9).

Cada imagem apresenta a área de 71.800 μm^2 , sendo a área total nas cinco fotografias (para cada caso) de 359.000 μm^2 , ou seja, o equivalente a 0,36 mm^2 .

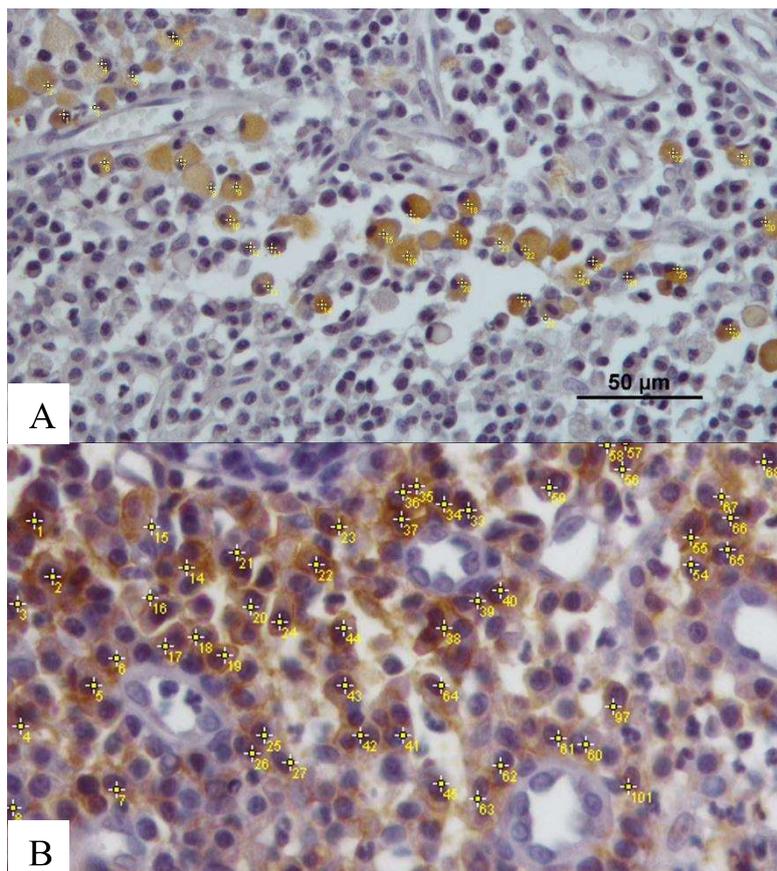


Figura 9 - Utilização do ImageJ® na contabilização da imunorreatividade. As células que apresentam cor castanha no citoplasma e/ou membrana, foram contabilizadas como positivas e as que apresentam coloração azul, como negativas. As marcas douradas representam a contabilidade assumida pelo programa. Contraste com Hematoxilina de Gill. A - Imagem representativa da marcação com o anticorpo FCV1-43; B - Imagem representativa da marcação com o anticorpo CD56.

2.4. Análise estatística

Os programas informáticos utilizados para a elaboração da base de dados e para a análise estatística foram, respetivamente, a folha de cálculo Microsoft Office Excel (Microsoft, EUA) e o programa de análise estatística GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, EUA).

Inicialmente, foi efetuada a análise estatística descritiva para caracterização da amostra de acordo com as seguintes variáveis: raça, idade (com a utilização dos grupos etários para gatos segundo Quimby *et al.*, 2021) e sexo.

A análise estatística foi realizada utilizando testes não paramétricos em todos os casos, dado que nenhum dos resultados obtidos e respetivas variáveis apresentaram uma distribuição normal (teste Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Na análise da influência da idade, raça ou sexo na presença de células FCV1-43⁺ e CD56⁺, foi feito um teste de Kruskal-Wallis (KW) entre grupos

(separadamente). Por outro lado, na análise de existência de relação entre a positividade para CVF e a positividade para células NK foi feito um teste não paramétrico, Mann-Whitney (MW).

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos, se $p \leq 0,05$, evidenciando a relação entre as diferentes variáveis.

2.5. Construção de um formulário de requisição de análise histopatológica e citológica

No âmbito da presente dissertação, constatou-se a necessidade de um formulário de requisição de análise histopatológica e citológica para uso exclusivo em Estomatologia Veterinária. A partir do formulário existente no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, foi desenvolvido um formulário direcionado para este efeito com o objetivo de ser usado no presente estudo e em estudos futuros nesta área.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da amostra estudada

As 40 amostras estudadas foram provenientes de 16 gatos (40%) do sexo feminino e 13 (32,5%) ao sexo masculino, não tendo dados disponíveis para o sexo em 11 amostras (27,5%) (Figura 10).

Em termos de distribuição etária da população em estudo, com base nas classes etárias propostas por Quimby e colaboradores (2021), observou-se uma maior frequência de gatos jovens adultos (1 a 6 anos de idade) e gatos adultos (7 a 10 anos de idade), ambas as classes com 9 casos (22,5%), seguindo-se a população de gatos sénior (idade superior a 10 anos) com 5 casos, (12,5%) e, finalmente, os gatos jovens até um ano (1 caso; 2,5%). Não foi possível ter conhecimento da idade de 16 animais (40%) (Figura 10).

Sob o ponto de vista racial, predominaram os gatos de raça Europeu Comum (23 casos, 57,5%), seguindo-se os gatos de raça Persa (4 casos, 10%) e os gatos de raça de Pelo Curto Britânico e de raça Azul da Rússia (ambas com um caso cada, 2,5%). Neste estudo, não tivemos informação, no arquivo, sobre a raça de 11 gatos (27,5%) (Figura 10).

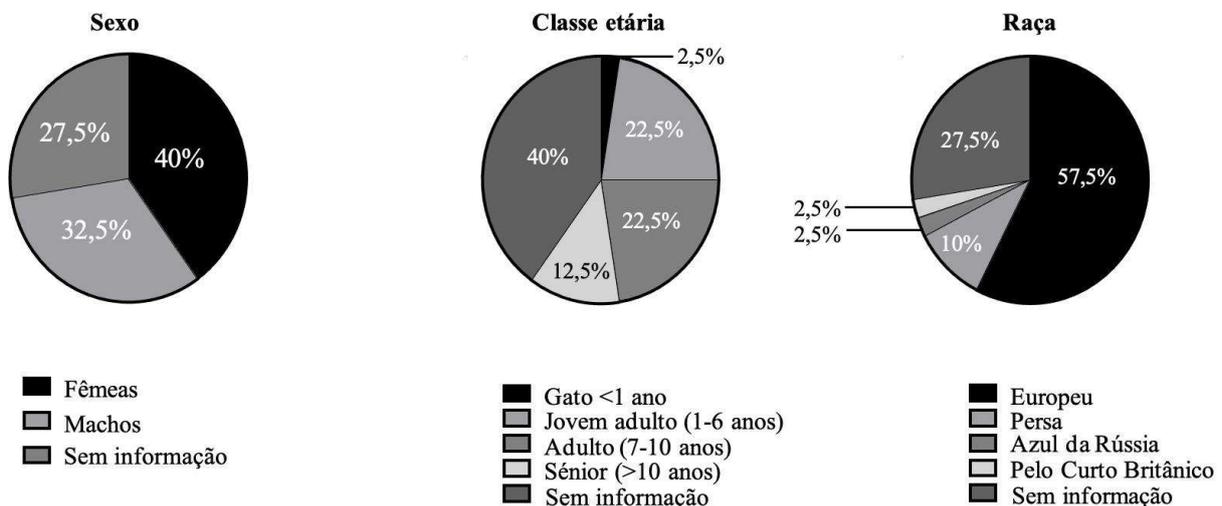


Figura 10 - Caracterização da amostra estudada (n=40): distribuição relativa segundo o sexo, a classe etária e a raça dos animais em estudo.

3.2. Avaliação da positividade para o CVF

Na análise da contagem de células FCV1-43⁺, foram identificados dois grupos: (i) grupo de amostras negativas (sem qualquer célula marcada), com 17 casos (42,5%) e (ii) grupo de amostras positivas, com 23 casos (57,5%).

Em relação aos diferentes grupos etários, considerando os casos positivos ao anticorpo anti-FCV1-43⁺, verificou-se uma média de 132,70 ± 40,87 células positivas em gatos jovens adultos (1-6 anos), 142,50 ± 80,05 células em gatos adultos (7-10 anos), 300,00 ± 129,00 células em gatos seniores (com mais de 10 anos). Os animais sem identificação da idade (SI) apresentaram 166,60 ± 43,59 células em média por caso (Figura 11). O teste de KW demonstrou que não existe uma associação significativa entre o grupo etário dos gatos e o número de células positiva que apresentavam os seus tecidos (p>0,05).

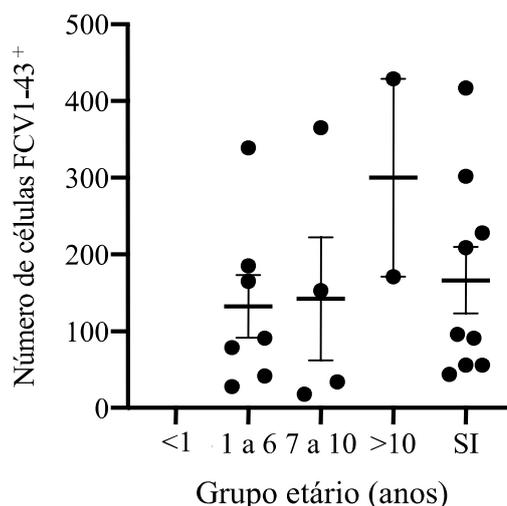


Figura 11 - Distribuição do número de células FCV1-43⁺ de acordo com o grupo etário (p=0,322; resultados apresentados com desvio para a média de células contabilizadas). Legenda SI - sem informação

Analisando a positividade para o antigénio CFV, de acordo com as diferentes raças, observou-se uma média de células positivas de 158,20 ± 33,38 nos gatos de raça Europeu Comum, 28,00 ± 0,00 células positivas nos gatos de raça Persa, 42,00 ± 0,00 células positivas nos gatos de raça Azul da Rússia. Nos animais sem qualquer identificação racial, contabilizaram-se em média 200,20 ± 63,47 células positivas (Gráfico 12). O teste estatístico aplicado (KW) demonstrou que não existe uma associação significativa entre a raça dos gatos e o número de células que marcaram positivas (p>0,05), ressalvando-se, no entanto, que algumas raças apresentavam apenas 1 animal.

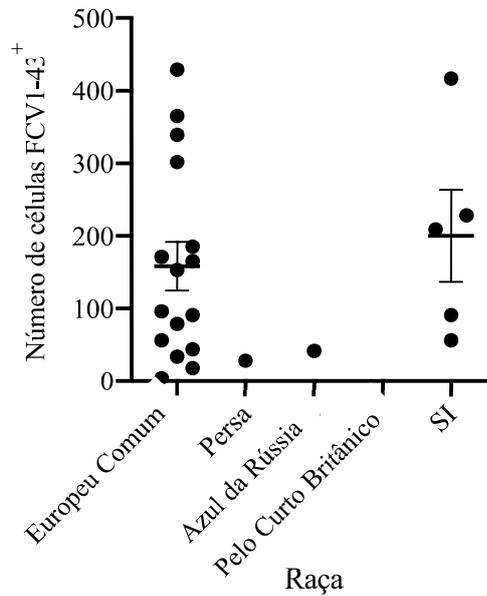


Figura 12 - Distribuição do número de células FCV1-43⁺ de acordo com a raça (teste de KW, p=0,283; resultados apresentados com desvio para a média). Legenda: SI- sem informação.

Observou-se uma média de $177,90 \pm 48,97$ células positivas nos machos, e $111,10 \pm 37,60$ células positivas nas fêmeas. Em animais sem identificação do sexo observaram-se $200,20 \pm 63,47$ células positivas (Figura 13), não existindo uma associação significativa entre o sexo dos gatos e o número de células positivas ao CVF ($p > 0,05$).

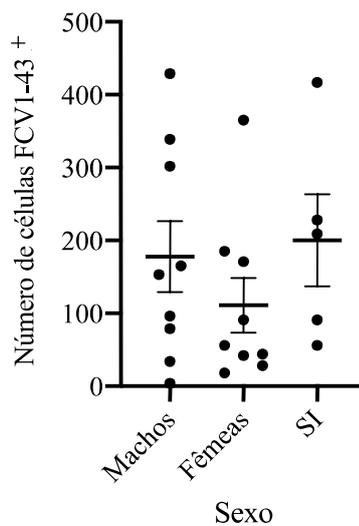


Figura 13 - Distribuição do número de células FCV1-43⁺ de acordo com o sexo (teste de KW, p=0,322; resultados apresentados com desvio para a média). Legenda: SI - sem informação.

3.3. Avaliação da população de células NK (CD56⁺)

De acordo com os diferentes grupos etários, observou-se uma média de $575,00 \pm 0,00$ células positivas em gatos até 1 ano, $631,30 \pm 112,10$ células positivas em gatos jovens adultos (1-6 anos), $785,70 \pm 145,40$ células positivas em gatos adultos (7-10 anos) e $869,20 \pm 151,40$ células positivas em gatos seniores (mais de 10 anos de idade). A média do número de células positivas no grupo sem identificação etária foi de $714,40 \pm 105,00$ (Gráfico 14). O teste KW demonstrou que não existe uma associação significativa entre a idade dos gatos e o número de células NK positivas ($p > 0,05$).

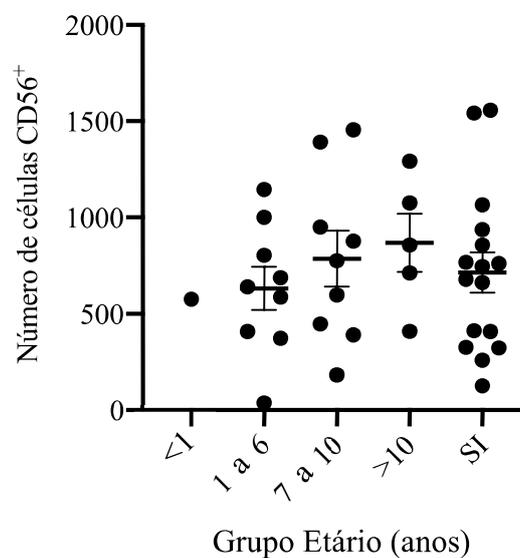


Figura 14 - Distribuição do número de células CD56⁺ de acordo com o grupo etário (teste de KW, $p=0,726$; resultados apresentados com desvio para a média). Legenda SI – sem indicação.

Analisando a quantidade de células que se apresentaram positivas de acordo com as diferentes raças, o número de NK foi maior nos gatos de raça Europeu Comum (de $817,30 \pm 80,41$), seguido do número de células positivas na raça Persa ($679,30 \pm 98,88$ células positivas). No animal de raça Azul da Rússia, apenas se observaram $37,00 \pm 0,00$ células positivas enquanto no gato de raça Pelo Curto Britânico se observaram $575,00 \pm 0,00$ células positivas. Nos animais sem informação de raça, observaram-se $634,20 \pm 120,30$ células positivas (Figura 15). Não se observou uma associação significativa entre a raça dos gatos e o número de células que marcaram positivas para o CD56 ($p > 0,05$).

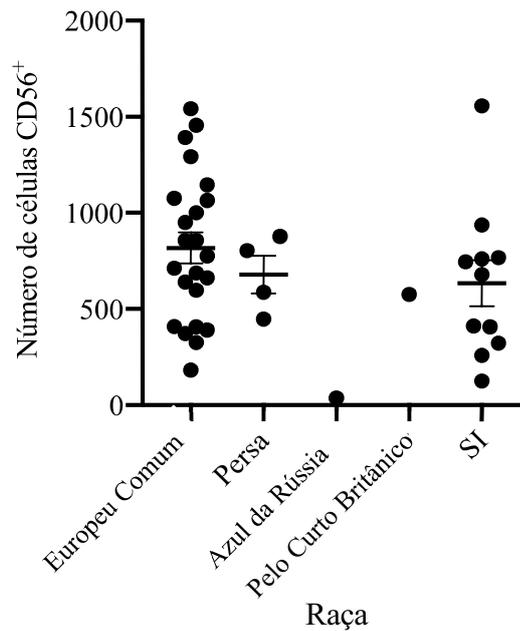


Figura 15 - Distribuição do número de células CD56⁺ de acordo com a raça (teste de KW, p=0,282; resultados apresentados com desvio para a média). SI – sem indicação.

Em relação ao sexo, observou-se uma média de 729,40 ± 86,72 células positivas nos machos e 790,40 ± 108,90 células positivas nas fêmeas. Um número ligeiramente menor foi observado nos animais sem referência ao sexo: 634,20 ± 120,30 (Figura 16) e sem associação significativa entre o sexo dos gatos e o número de células que marcaram positivas (Figura 16).

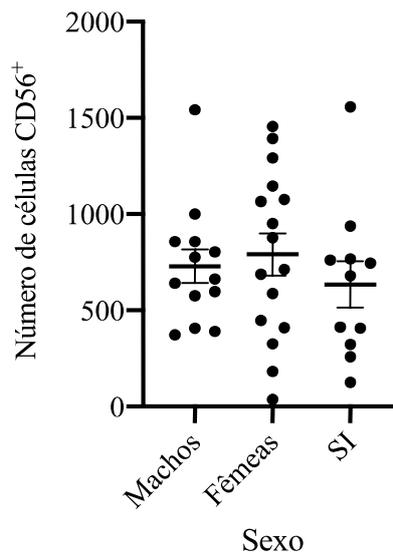


Figura 16 - Distribuição do número de células CD56⁺ de acordo com o sexo (teste de KW, p=0,503; resultados apresentados com desvio para a média). SI – sem indicação.

3.4. Relação entre positividade ao CVF e a população de células NK

Considerando apenas as amostras positivas para o CVF com uma média de $90,05 \pm 20,05$ células e o número de células positivas para NK, com uma média de $727,60 \pm 60,82$ células, verificaram-se diferenças significativas entre os grupos (teste de MW, $p < 0,0001$), não se verificando relação entre os marcadores (Figura 17).

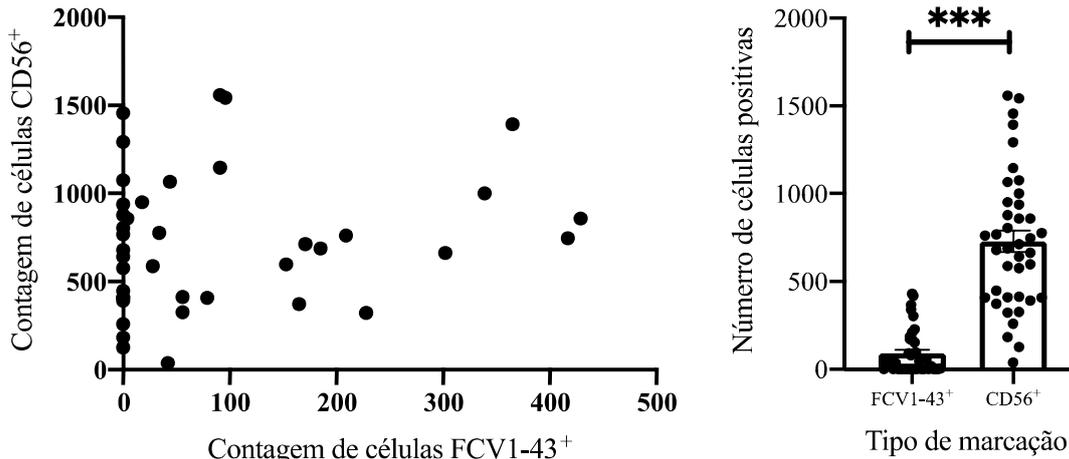


Figura 17 - Análise da relação da contagem de células FCV1-43⁺ e CD56⁺: A) Dispersão do número de células FCV1-43⁺ e do número de células CD56⁺ de cada amostra; B) Comparação entre a marcação de células FCV1-43⁺ e a marcação de células CD56⁺ (teste de MW: Z(U)=63, $p < 0,0001$, R=9,9).

3.5. Proposta de requisição de análise histopatológica e citológica de lesões orais do gato

A ficha de requisição de análise histopatológica e citológica já existente no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD foi adaptada com a incorporação de uma figura adaptada do trabalho de Falcão e colaboradores (2020) e da autoria de um dos orientadores do presente trabalho. Esta imagem permitirá ao clínico e também ao anatomopatologista uma melhor representação visual da localização e extensão das lesões, sendo uma ferramenta na colaboração entre os diversos profissionais envolvidos no processo de análise anatomopatológica e diagnóstico das lesões com sede na cavidade oral do gato.

REQUISIÇÃO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E CITOLÓGICA LESÕES DA CAVIDADE ORAL DO GATO

Data da Colheita _____ Data de Entrada _____ N° de Análise _____

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

Nome _____ N° _____ Raça _____

Idade _____ Sexo F M Castrado S N

IDENTIFICAÇÃO DO MÉDICO VETERINÁRIO

Nome _____

Centro de atendimento médico-veterinário _____

Morada _____

Telefone _____ E-mail _____

IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

Nome _____ Telefone _____

E-mail _____

INFORMAÇÕES E DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Método de colheita: Biópsia Exérese Citologia Outro _____

Localização _____

Dimensões _____

Aspeto _____

Ulcerativo Proliferativo Outro _____

Sinais clínicos _____

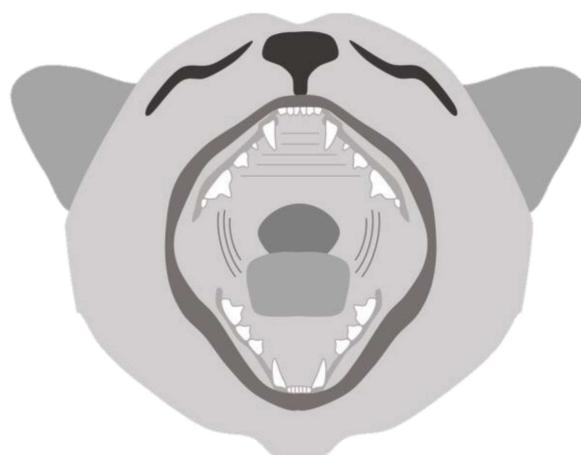
Tratamentos _____

Exames complementares _____

Suspeita(s) _____

Data _____ Assinatura _____

Identifique a lesão no esquema



4. DISCUSSÃO

Este estudo incluiu amostras provenientes de dois serviços de Histopatologia Veterinária, apresentando 40 casos, de 40 animais, o que pode ser considerada uma dimensão razoável de casos de GEFC, permitindo retirar conclusões genéricas, mas com algumas limitações.

Dentro dos constrangimentos observados, a ausência de dados clínicos dos animais estudados é a principal, não permitindo uma caracterização rigorosa da população em estudo. Esta é uma limitação comum em estudos histopatológicos, uma vez que, frequentemente, não existe o cuidado em facultar a informação clínica aquando da recolha e envio para o laboratório de anatomia patológica. No âmbito deste estudo, foi identificado a inexistência de um formulário de requisição de análise histopatológica e citológica para uso exclusivo em Estomatologia Veterinária. Estando esta área em franca expansão e para uma melhor comunicação entre o clínico e o anatomopatologista (Saraiva & Carreira, 2016), e de forma a colmatar esta lacuna, foi proposto um formulário para a área da Estomatologia Veterinária e poderá ser utilizado futuramente noutros estudos clínicos

A natureza multifatorial da GEFC está associada a agentes infecciosos e não infecciosos, em particular a infeções virais, descrito nestes casos, como tendo um aumento do rácio linfócitos T/ linfócitos B (Harley *et al.*, 2011). Por isto, tem sido estudado o papel de diversos agentes infecciosos na inflamação oral, nomeadamente, o herpes vírus felino, o VIF, o VLeF e o CVF (Quimby *et al.*, 2008), o que levou a explorar o papel deste último nestes casos de gatos com gengivoestomatite crónica.

Os resultados por nós obtidos na marcação das células FCV1-43⁺ corroboram os já publicados por outras equipas. Rolim e colaboradores (2017) não identificaram a presença de agentes virais nas lesões orais, quer por PCR quer por IHQ. Por outro lado, Henzel e colaboradores (2012) identificaram este vírus por PCR na cavidade oral de gatos com sinais clínicos, bem como em animais saudáveis, que demonstraram uma prevalência de CVF numa população de gatos no Brasil, e maior em indivíduos saudáveis do que naqueles com sinais clínicos. Em 1991, foi reportado que gatos infetados apenas com CVF não exibiram maior frequência de GEFC ou maior gravidade das lesões (Tenorio *et al.*, 1991). Assim sendo, os resultados obtidos nestes trabalhos, bem como neste presente estudo, não evidenciam a correlação entre a presença do agente patogénico e os parâmetros clínicos estudados.

O facto do CVF não ter sido identificado em algumas amostras não implica necessariamente a sua ausência, uma vez que as biópsias orais que se recolhem para a pesquisa deste agente representam apenas uma pequena porção das lesões observadas, o que pode conduzir a resultados falso-negativos, uma vez que não sabemos como o agente se distribui pelos tecidos afetados (Rolim *et al.*, 2017).

A maioria dos antivirais usados em animais de companhia inibem apenas a replicação de vírus de DNA ou retrovírus e os tratamentos antivirais para infeções por CVF não são uma prática comum na atualidade. A ribavirina, um dos poucos agentes antivirais capazes de inibir a replicação do CVF *in vitro*, revelou-se tóxica para gatos e com efeitos colaterais, impedindo o seu uso sistémico. Existe a necessidade de continuar a investigar novas estratégias terapêuticas da estomatite crónica. As opções recomendadas incluem extrações dentárias múltiplas ou radicais, dependendo da gravidade dos sinais clínicos, antibióticos e limpeza dentária rigorosa, corticosteroides e/ou outros imunossupressores ou medicamentos imunomoduladores (ciclosporina A, clorambucilo, sais de ouro ou talidomida) (Radford *et al.*, 2009).

O uso do IFN- Ω felino e interferões humanos para aplicação intra-lesional, ou sistémica combinada com intra-lesional tem sido indicado em estudos como eficaz no tratamento de estomatite crónica por infeção por CVF (Matsumoto *et al.*, 2018). Os tratamentos imunomoduladores são métodos terapêuticos ainda em desenvolvimento, sendo por isso importante a pesquisa de vários tipos de IFN em mucosa de gato com GEFCF. Este facto realça a importância deste tipo de estudos como o aqui apresentado, o qual contribui para a caracterização histológica e imunológica da cavidade oral e, por conseguinte, para a identificação de possíveis alvos terapêuticos a explorar no futuro (Bluestone & Tang, 2015).

De entre as várias populações inflamatórias, o estudo das células *natural killer*, CD56⁺, foi considerado o mais indicado por ser reconhecido o efeito citotóxico destas células sobre agentes patogénicos, nomeadamente vírus (Lodoen & Lanier, 2006; Vivier *et al.*, 2008). Na maioria das amostras estudadas, foi identificado um número consideravelmente elevado de células NK, e apesar de ser importante referir que o marcador CD56 é também recetor de reconhecimento de vários agentes patogénicos, incluindo fungos (Acker, 2017; Ziegler *et al.*, 2017), não houve evidência histológica de formas fúngicas nas amostras estudadas.

Apesar do papel das células NK no combate às infeções virais, neste estudo não se observou uma relação entre a presença de CVF e a quantidade de células NK na mucosa oral. Esta conclusão vai ao encontro ao referido por Simões e colegas (2012), que não encontraram

diferenças entre o número total de células NK em gatos infetados com VIF em relação aos gatos saudáveis utilizados como grupo de controlo, em pesquisa de células NK em linfonodo. Esses autores sugeriram que a infeção por VIF pode afetar o recrutamento, morte e/ou proliferação de células NK. Pelo facto de haver uma lacuna no que diz respeito ao conhecimento do papel dos vírus correlacionado com a presença de células NK em gato, é premente o desenvolvimento de trabalhos futuros que investiguem esta relação nesta espécie animal.

A caracterização histológica e imunológica da cavidade oral, tanto em amostras com doença como em amostras de animais saudáveis, assim como o conhecimento dos mecanismos inflamatórios e da sua etiologia, são fundamentais para a compreensão destes mecanismos e para o desenvolvimento de novas terapias que se direcionem quer aos agentes etiológicos presentes, quer aos processos inflamatórios envolvidos. Desta forma, no futuro é importante o estudo da expressão de outros tipos de células inflamatórias, além das células NK e de outros fatores envolvidos, permitindo um mapeamento da GECF, da sua etiologia e, mais importante ainda, de alvos terapêuticos para o seu eficaz tratamento.

5. CONCLUSÃO

Com este estudo, foi possível obter algumas conclusões:

Não observamos influência da idade, raça ou sexo dos gatos na presença e na quantidade de CFV encontrados nas lesões de gengivoestomatite crónica.

Igualmente, para a marcação das células NK, não se observou qualquer influência destas variáveis na quantidade de células positivas nestas lesões.

Podemos ainda concluir que a presença de células NK em gatos com gengivoestomatite crónica não se deverá exclusivamente à presença do CVF nestas lesões da mucosa oral.

Encontrámos um número elevado de células NK, mesmo quando não se observou a presença de CVF.

Isto confirma a ideia de etiologia multifatorial, além dos vírus, que justificam também o elevado número de células NK presentes.

Concluimos haver a necessidade uma ficha de requisição específica para lesões da cavidade oral, pelo que propusemos uma neste trabalho

Novos estudos no domínio da imunologia oral são também de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos, que serão alvos terapêuticos mais definidos e apropriados para esta doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acker, H. H. Van. (2017). CD56 in the immune system : more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunology*, (8), 1–9.
- Afonso, M. M., Pinchbeck, G. L., Smith, S. L., Daly, J. M., Gaskell, R. M., Dawson, S., & Radford, A. D. (2017). A multi-national european cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. *Vaccine*, 35(20), 2753–2760.
- Arnon, T. I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., & Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *European Journal of Immunology*, 31(9), 2680–2689.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2012). *Fundamentos de imunologia*. LIDEL, 269–286.
- Arzi, B., Clark, K. C., Sundaram, A., Spriet, M., Verstraete, F. J. M., Walker, N. J., Loscar, M. R., Fazel, N., Murphy, W. J., Vapniarsky, N., & Borjesson, D. L. (2017). Therapeutic efficacy of fresh, allogeneic mesenchymal stem cells for severe refractory feline chronic gingivostomatitis. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(8), 1710–1722.
- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2002). *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, 621–635.
- Bellows, J. (2010). *Feline dentistry: oral assessment, treatment, and preventative care* (1). Blackwell Publishing, 28–83.
- Bhella, D., Gatherer, D., Chaudhry, Y., Pink, R., & Goodfellow, I. G. (2008). Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *Journal of Virology* 82(16), 8051–8058.
- Bluestone, J. A., & Tang, Q. (2015). Immunotherapy: Making the case for precision medicine. *Science Translational Medicine*, 7(280), 5–8.
- Burton, D. R. (1985). Immunoglobulin G: functional sites. *Molecular Immunology*, 22(3), 161–206.

- Camy, G. (2003). Management of a cat with chronic gingivitis stomatitis. *Le Point Veterinaire*, 236.
- Carvalho, A. J. da S. (2020). *Calicivirose felina – um estudo retrospectivo*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 18-19.
- Catarino, J., Faisca, P., Lourenço, L., Viegas, C., Requicha, J., & Pires, M. d. A. (2020). The impact of M2 macrophages on feline chronic gingivostomatitis: a pilot study. *Journal of Comparative Pathology*, 174(2012), 190.
- Dawson, S., Wiloughby, K., Gaskell, R., Wood, G., & Chalmers, W. (2001). A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17–22.
- Di Vito, C., Mikulak, J., & Mavilio, D. (2019). On the way to become a natural killer cell. *Frontiers in Immunology*, (10), 1–15.
- Dick, C. P., & Johnson, R. P. (1989). Immunohistochemical detection of feline calicivirus in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 53(3), 331–335.
- Diehl, K., & Rosychuk, R. A. W. (1993). Feline gingivitis – stomatitis-pharyngitis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 23(1), 139–153.
- Dolieslager, S. M. J., Riggio, M. P., Lennon, A., Lappin, D. F., Johnston, N., Taylor, D., & Bennett, D. (2011). Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 93–98.
- Dowers, K. L., Hawley, J. R., Brewer, M. M., Morris, A. K., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2010). Association of Bartonella species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(4), 314–321.
- Druet, I., & Henet, P. (2017). Relationship between Feline calicivirus load, oral lesions, and outcome in feline chronic gingivostomatitis (caudal stomatitis): retrospective study in 104

- cats. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(DEC), 1–7.
- Ehrhart, E. J., & Withrow, S. J. (2013). Biopsy Principles. *Small Animal Clinical Oncology*, 143–147.
- Falcão, F., Faísca, P., Viegas, I., de Oliveira, J. T., & Requicha, J. F. (2020). Feline oral cavity lesions diagnosed by histopathology: a 6-year retrospective study in Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(10), 977–983.
- Ferro, A. (2014). *Imunohistoquímica*. Amadeu Borges Ferro, 51–66.
- Früh, K., Gruhler, A., Krishna, R. M., & Schoenhals, G. J. (1999). A comparison of viral immune escape strategies targeting the MHC class I assembly pathway. *Immunological Reviews*, 168(4), 157–166.
- Gattenlöhner, S., Stühmer, T., Leich, E., Reinhard, M., Etschmann, B., Völker, H. U., Rosenwald, A., Serfling, E., Bargou, R. C., Ertl, G., Einsele, H., & Müller-Hermelink, H. K. (2009). Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development. *American Journal of Pathology*, 174(4), 1160–1171.
- Geissler, K., Schneider, K., & Truyen, U. (2002). Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes on the capsid protein of feline calicivirus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(1), 55–60.
- Greenfield, B. (2017). Chronic feline gingivostomatitis: proven therapeutic approaches & new treatment options. *Today's Veterinary Practice*, 7(1), 27–38.
- Hammer, Q., Rückert, T., & Romagnani, C. (2018). Natural killer cell specificity for viral infections. *Nature Immunology*, 19(8), 800–808.
- Harley, R., Gruffydd-Jones, T. J., & Day, M. J. (2003). Characterization of immune cell populations in oral mucosal tissue of healthy adult cats. *Journal of Comparative Pathology*, 128(2–3), 146–155.
- Harley, R., Gruffydd-Jones, T. J., & Day, M. J. (2011). Immunohistochemical characterization of oral mucosal lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *Journal of Comparative*

- Pathology*, 144(4), 239–250.
- Healey, K. A. E., Dawson, S., Burrow, R., Cripps, P., Gaskell, C. J., Hart, C. A., Pinchbeck, G. L., Radford, A. D., & Gaskell, R. M. (2007). Prevalence of feline chronic gingivostomatitis in first opinion veterinary practice. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(5), 373–381.
- Henzel, A., Brum, M. C. S., Lautert, C., Martins, M., Lovato, L. T., & Weiblen, R. (2012). Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(2), 560–568.
- Hutchison, M., & Johnston, N. (1998). Acquired feline oral cavity disease. *Practice*, 20(8), 413.
- Jones, P., Owen, J. A., Stranford, S., & Punt, J. (2019). *Kuby Immunology* (8). W. H. Freeman and Company, 175–1284.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica* (11). Guanabara Koogan, 1–22.
- Kaiser, W. J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V., & Goodfellow, I. G. (2006). Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *Journal of General Virology*, 87(2), 363–368.
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 313–326.
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 3–6.
- Knowles, J. O., MacArdle, F., Dawson, S., Carter, S. D., Gaskell, C. J., & Gaskell, R. M. (1991). Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. *Veterinary Microbiology*, 27(3–4), 205–219.
- Leshchyn'ska, I., & Sytnyk, V. (2015). Intracellular transport and cell surface delivery of the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Bioarchitecture*, 5(3–4), 54–60.
- Liebich, H.-G., & König, H. E. (2004). *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook And Colour Atlas*. Schattauer Verlag, 277–287.

- Lipsker, D., & Thomas, P. (2019). Gammopathies. *Braun-Falco's Dermatology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1–9.
- Lodoen, M. B., & Lanier, L. L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current Opinion in Immunology*, 18(4), 391–398.
- Lommer, M. J. (2013). Oral inflammation in small animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 43(3), 555–571.
- Lyon, K. F. (2005). Gingivostomatitis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 35(4), 891–911.
- Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2017). Caliciviridae and Astroviridae. *Fenner's Veterinary Virology*, 497–510.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W., & Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409(6823), 1055–1060.
- Matsumoto, H., Teshima, T., Iizuka, Y., Sakusabe, A., Takahashi, D., Amimoto, A., & Koyama, H. (2018). Evaluation of the efficacy of the subcutaneous low recombinant feline interferon-omega administration protocol for feline chronic gingivitis-stomatitis in feline calicivirus-positive cats. *Research in Veterinary Science* (121) 53–58.
- Miller, J. S. (2002). Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Investigation*, 20(3), 405–419.
- Neto, N. D., Porpino, M. T. M., Antunes, H. D. S., Rodrigues, R. C. V., Perez, A. R., Pires, F. R., Siqueira, J. F., & Armada, L. (2018). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. *Journal of Applied Oral Science* (26), 1–8.
- Niemiec, B. (2008). Oral Pathology. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2), 59–71.
- Niza, M. M. R. E., Mestrinho, L. A., & Vilela, C. L. (2004). Gengivo-estomatite crónica felina - um desafio clínico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99(551), 127–135.

- O'Connell, T. X., Horita, T. J., & Kasravi, B. (2005). Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American Family Physician*, 71(1), 105–112.
- Orange, J. S., Fassett, M. S., Koopman, L. A., Boyson, J. E., & Strominger, J. L. (2002). Viral evasion of natural killer cells. *Nature Immunology*, 3(11), 1006–1012.
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and Cell Biology*, 89(2), 216–224.
- Peñaflor-Téllez, Y., Trujillo-Uscanga, A., Escobar-Almazán, J. A., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Immune response modulation by caliciviruses. *Frontiers in Immunology*, (10), 1–14.
- Pires, M. d. A., Coelho, A., Palmeira, C., Paiva Cardoso, M., Seixas, F., & Rodrigues, J. (2010). *Protocolos de Imunologia*. Série Didática. Ciências Aplicadas. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1–79.
- Povey, C., & Ingersoll, J. (1975). Cross-protection among feline caliciviruses. *Infection and Immunity*, 11(5), 877–885.
- Quimby, J., Gowland, S., Carney, H. C., DePorter, T., Plummer, P., & Westropp, J. (2021). 2021 AAHA/AAFP feline life stage guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 57(2), 51–72.
- Quimby, J. M., Elston, T., Hawley, J., Brewer, M., Miller, A., & Lappin, M. R. (2008). Evaluation of the association of Bartonella species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(1), 66–72.
- Radford, A. D., Addie, D., Belák, 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. (2009). Feline calicivirus infection ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 556–564.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*,

42(4), 405–426.

Reiter, A. M., & Gracis, M. (2018). *BSAVA Manual of Canine and Feline Dentistry and Oral Surgery* (4). British Small Animal Veterinary Association, 172–179.

Rolim, V. M., Pavarini, S. P., Campos, F. S., Pignone, V., Faraco, C., Muccillo, M. de S., Roehe, P. M., da Costa, F. V. A., & Driemeier, D. (2017). Clinical, pathological, immunohistochemical and molecular characterization of feline chronic gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(4), 403–409.

Saraiva, A. L., & Carreira, R. P. (2016). O Clínico e o anatomopatologista. M. d. A. Pires & R. P. Carreira. *Descrição Anatmopatológica Em Medicina Veterinária*. CECAV, 267–280.

Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E. A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S. L. H. V., Degli-Esposti, M. A., & Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42(4), 501–510.

Souza, F. V. (2008). *Estomatite linfo-plasmocitária em um cão doméstico – relato de caso*. UCB (Departamento de Clínica Médica e cirúrgica de Pequenos Animais).

Tenorio, A. P., Franti, C. E., Madewell, B. R., & Pedersen, N. C. (1991). Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 29(1–2), 1–14.

Tizard, I. (2018). Immunity to viruses. In *Veterinary Immunology* (10). Elsevier. 872–910.

Torres, JM. (2020). *Estudo da população de linfócitos em gengivoestomatite crônica felina*. Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Van Erp, E. A., Van Kampen, M. R., van Kasteren, P. B., & De Wit, J. (2019). Viral infection of human natural killer cells. *Viruses*, 11(3), 1–13.

Vapniarsky, N., Simpson, D. L., Arzi, B., Taechangam, N., Walker, N. J., Garrity, C., Bulkeley, E., & Borjesson, D. L. (2020). Histological, immunological, and genetic analysis of feline chronic gingivostomatitis. *Frontiers in Veterinary Science* (7), 1–11.

Vieira, MV. (2021). *Identificação de células inflamatórias e de agentes etiológicos em*

gingivoestomatite crónica felina. Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica.
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503–510.

Weeks, S., & Brewery, M. G. (2018). *The roles of cellular chaperones in positive sense rna virus replication complex assembly and function*. The University of Michigan, 1–157.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6), 673–682.

Winer, J. N., Arzi, B., & Verstraete, F. J. M. (2016). Therapeutic management of feline chronic gingivostomatitis: a systematic review of the literature. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(7), 1–10.

Zachary, J. F. (2017). *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (6). Elsevier, 73–131.

Ziegler, S., Weiss, E., Schmitt, A. L., Schlegel, J., Burgert, A., Terpitz, U., Sauer, M., Moretta, L., Sivori, S., Leonhardt, I., Kurzai, O., Einsele, H., & Loeffler, J. (2017). CD56 is a pathogen recognition receptor on human natural killer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.