

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

ROBERTA PICCIUTO DUARTE

**Expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 na
Gengivoestomatite Crônica Felina**

Araçatuba
2019

ROBERTA PICCIUTO DUARTE

**Expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 na
Gengivoestomatite Crônica Felina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Meireles Vasconcelos

Araçatuba
2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca
da FMVA / UNESP

D812e Duarte, Roberta Picciuto

Expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 na
Gengivoestomatite Crônica Felina / Roberta Picciuto Duarte.
-- Araçatuba, 2019 58 f. : tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Gisele Fabrino Machado

Coorientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Cavidade oral. 2. Gatos. 3. Inflamação. 4. Linfócitos T.
5. Reação em cadeia da polimerase



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

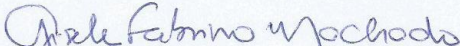
Título: Expressão Gênica de PD1/PDL1 e FoxP3 na Gengivoestomatite Crônica Felina


AUTORA: ROBERTA PICCIUTO DUARTE

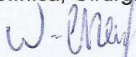
ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

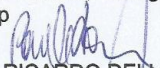
COORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. PAULO RICARDO DELL'ARMELENA ROCHA
Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental / Universidade Paulista - Câmpus de Indianópolis/UNIP


Dra. ANALY RAMOS MENDES FERRARI
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 16 de dezembro de 2019.

Dedico este trabalho à minha filha Agnes, que me ensina todos os dias sobre amor, paciência, perdão e que tudo tem o seu tempo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Gisele Fabrino Machado, por ter aceitado a continuar trabalhando com felinos.

Ao Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles e Alex Akira Nakamura, pela disponibilidade e paciência.

Ao Luís Gustavo Narciso pela parceria para análise bioquímica.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, especialmente à médica veterinária Tatiane Sampaio, assim como toda a equipe pela parceria.

Aos colegas de laboratório, Karen Março, assim como todos do laboratório de imunologia e de ornitopatologia, Jaqueline, Gabriela, Flávia, Sidney e Bruna, que de certa forma estavam por perto, solidários, e principalmente pela convivência diária.

À banca examinadora do Exame Geral de Qualificação, Professores Valéria Marçal Félix de Lima e Paulo Ricardo Dell Armelina Rocha, pela orientação, assim como à banca examinadora da Defesa da presente tese, Professores Valéria Marçal Félix de Lima, Paulo Ricardo Dell Armelina Rocha, Wagner Luis Ferreira e Analy Ramos Mendes, pela disponibilidade, incalculável e ajuda.

À FMVA – Unesp e ao Programa de Pós-Graduação.

Por fim, à Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

DUARTE, RP. **Expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 na gengivoestomatite crônica felina.** 2019. 58 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica do PD-1 e seu ligante PD-L1, e do FoxP3 em felinos com gengivoestomatite crônica (GCF). Adicionalmente, foi feita uma caracterização do perfil dos indivíduos acometidos com a enfermidade a fim de se verificar a associação entre os resultados encontrados com os aspectos clínicos das lesões e com as análises histopatológicas das lesões. Para tal, após avaliação clínica, foram colhidas amostras da mucosa oral de sete gatos acometidos por gengivoestomatite crônica e de sete gatos aparentemente saudáveis para controle. Também foi feita a coleta de sangue para extração do soro e *swab* orofaríngeo para triagem das principais viroses felinas como Calicivirus (FCV), Herpesvirus (FHV-1), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Coronavírus (FCoV), assim como avaliação da função renal desses animais. O fragmento colhido foi dividido em duas partes, uma para processamento histopatológico e outra para PCR em tempo real. Foi realizada imunohistoquímica para detecção do FCoV em específico nas lesões dos gatos com GCF. Como resultado, verificou-se que cinco dos sete gatos com a doença incluídos no estudo, eram machos, adultos, sem raça definida, castrados, viviam em ambiente com superlotação de animais, tinham acesso livre para a

rua, se alimentavam de uma dieta mista composta por ração e comida caseira, e recebiam reforços anuais de vacinação. Cinco gatos com GCF eram negativos para FCV, FHV-1, FIV e FeLV, à imuno-histoquímica, não foi detectado o FCoV em nenhuma amostra. Na avaliação histopatológica, em seis gatos foram observadas graus de inflamação mínima a moderada. A expressão gênica do PD-L1 estava significativamente aumentada em gatos acometidos com GCF. Deste modo, é possível concluir que o aumento da expressão do PD-L1 contribui para a inibição da atividade dos linfócitos T em gatos com GCF. As principais infecções virais felinas parecem não estar associadas ao desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Cavidade Oral. Gatos. Inflamação. Linfócitos T. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

DUARTE, RP. **Gene expression of PD-1/PD-L1 and FoxP3 in feline chronic gingivostomatitis.** 2019. 58 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The main objective of the present study was to evaluate the gene expression of PD-1 and its ligand PD-L1, and FoxP3, as immune response modulators, in cats diagnosed with feline chronic gingivostomatitis (FCGS). Additionally, it was performed a characterization of the feline profile with FCGS the association between the results found with clinical evaluation of oral cavity as well as histopathological analysis. For this, oral mucosa samples were collected from seven cats with FCGS and seven from healthy cats. Previously, clinical evaluation was done and oral lesion severity was scored by a system. Blood samples and oropharyngeal swabs were collected for major feline viruses screening, such as Calicivirus (FCV), Herpesvirus (FHV-1), Feline Immunodeficiency Virus (FIV), Feline Leukemia Virus (FeLV) and Coronavirus (FCoV), and also, renal function evaluation. The oral mucosa fragment was divided into two parts, one for histopathological processing and another for RT-PCR. Immunohistochemistry was performed to detect FCoV in lesions of cats with FCGS. As result, it was found that five of seven cats with FCGS included in the study were males, adults and mixed breed. All cats were neutered, lived in a multi-cat household, had an outdoor lyifestyle, received a mixed diet, and received routine booster immunizations. Five cats were negative for FCV, FHV-

1, FIV and FeLV infection, no one was positive for FCoV at immunohistochemistry. At histopathological evaluation, it was observed minimal to moderate degrees of inflammation in six cats. PD-L1 gene expression was significantly increased in cats with FCGS. Thus, it can be concluded that increased PD-L1 expression contributes to inhibition of T lymphocyte activity in cats with FCGS. The main feline viral infections do not appear to be associated with the development of the disease.

Keywords: Cats. Inflammation. Oral cavity. T-Lymphocytes. Real-Time Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Score clínico para a avaliação da cavidade oral de gatos com gengivoestomatite crônica 23
- Tabela 2 – Sequências de *primers* utilizados para quantificação gênica do PD-1, PD-L1, FoxP3 e dos genes de referência nas amostras de gatos com gengivoestomatite crônica e gatos saudáveis por RT-PCR 27
- Tabela 3 – Dados sobre a análise clínica e histopatológica das lesões orais e resultados da triagem das principais infecções virais e função renal de gatos com gengivoestomatite crônica 29
- Tabela 4 – Cts da expressão dos genes testados em duplicata (Ct1 e Ct2) ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ E $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 54
- Tabela 5 – Média e desvio padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos grupos controle e doentes para gatos com gengivoestomatite crônica de acordo com os genes PD-1, PD-L1 e FoxP3 56
- Tabela 6 – Número de animais positivos e negativos para gengivoestomatite crônica felina de acordo com a doença viral 56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotografias ilustrando os gatos n° 2, 3 e 7 que receberam *score* clínico 1 na avaliação do aspecto clínico da gengivoestomatite crônica 30
- Figura 2 – Fotografias ilustrando os gatos n° 1, 4 e 5 que receberam *score* clínico 2 na avaliação do aspecto clínico da gengivoestomatite crônica 31
- Figura 3 – Fotografias em diferentes ângulos do gato n° 6 que recebeu *score* clínico 3 na avaliação do aspecto clínico da gengivoestomatite crônica 32
- Figura 4 – Fotomicrografias do fragmento de mucosa oral do gato n° 3 34
- Figura 5 – Fotomicrografias dos fragmentos de mucosa oral dos gatos n° 1 35
- Figura 6 – Fotomicrografias dos fragmentos de mucosa oral dos gatos n° 6 36
- Figura 7 – Gráficos de ampliações do genes PD-1(A), PD-L1(B), FoxP3(C), YWHAZ(D), RPL17(E) e HPRT(F), em gatos com gengivoestomatite crônica e em gatos saudáveis 37
- Figura 8 – Gráfico com a média e desvio padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos grupos controle e doente de acordo com os genes PD-1, PD-L1 e FoxP3 38
- Figura 9 – Gráficos das curvas de *melting* do genes PD-1(A), PD-L1(B), FoxP3(C), YWHAZ(D), RPL17(E) e HPRT(F), em gatos com gengivoestomatite crônica e em gatos saudáveis 53

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|----------------------------------------------|
| APC | Célula apresentadora de antígenos |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| FCV | Calicivirus Felino |
| FCoV | Coronavirus Felino |
| FelV | Vírus da Leucemia Felina |
| FHV-1 | Herpesvirus Felino |
| FIV | Vírus da Imunodeficiência Felina |
| GCF | Gengivoestomatite Crônica Felina |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| IFN | Interferon |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| LPS | Lipopolissacarídeo (bacteriano) |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| PD | Do inglês, <i>Programmed Cell Death</i> |
| PIF | Peritonite Infecciosa Felina |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| SRD | Sem raça definida |
| TCR | Receptor de células T |
| TGF | Fator de Transformação do Crescimento |
| TLR | Receptor de membrana TOLL |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| °C | Grau Celsius |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 Justificativa e objetivo geral | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODO | 21 |
| 3.1 Animais e ética em experimentação animal | 21 |
| 3.2 Colheita das amostra | 22 |
| 3.3 Análise histopatológica | 24 |
| 3.4 Imuno-histoquímica para detecção de FCoV | 25 |
| 3.5 Extração RNA e síntese do cDNA | 25 |
| 3.6 Ensaio de RT-PCR | 26 |
| 3.7 Análise da expressão gênica | 27 |
| 3.8 Análise estatística | 27 |
| 4 RESULTADOS | 28 |
| 4.1 Caracterização dos felinos | 28 |
| 4.2 Análise histopatológica | 32 |
| 4.3 Imuno-histoquímica | 33 |
| 4.4 Ensaio de RT-PCR | 37 |
| 4.5 Resultados da expressão gênica e estatística | 38 |
| 5 DISCUSSÃO | 39 |
| 6 CONCLUSÃO | 45 |
| REFERÊNCIAS | 46 |
| APÊNDICES | 53 |
| ANEXOS | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A gengivoestomatite crônica felina (GCF), também conhecida por complexo gengivite-estomatite-faringite dos felinos, complexo gengivite-estomatite linfoplasmocitário, faucite-estomatite-gengivite crônica, estomatite ulcerativa crônica, entre outros, é uma doença comum em gatos, referida como a segunda doença mais frequente da cavidade oral de gatos, que apresenta caráter crônico, e é relacionada a uma anormalidade imune de etiologia ainda desconhecida (DIEHL; ROSYCHUK, 1993; LOMMER, 2013; LYON, 2005).

Diversas etiologias têm sido apontadas para o desenvolvimento da GCF, incluindo vírus, bactérias, fatores genéticos, nutrição, ambiente e até a domesticação (LYON, 2005). Já foram encontradas associações entre inflamação em cavidade oral com doenças virais causadas pelo Calicivirus (FCV), Herpesvirus (FHV-1), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Coronavírus Felino (FCov), o vírus da Peritonite Infecciosa Felina, e Vírus da Panleucopenia Felina (LYON, 2005). Estudos recentes têm encontrado uma alta prevalência de positividade para o Calicivirus em gatos com gengivoestomatite crônica (DOLIESLAGER et al., 2013; DOWERS et al., 2010; HARLEY et al., 1999; THOMAS et al., 2017).

Ao exame físico, podem ser observadas lesões inflamatórias locais ou difusas por toda a cavidade oral, com gengivite associada à doença periodontal, principalmente na área da mucosa oral/gengival próxima aos pré-molares e molares, além de faucite. Geralmente, a GCF inicia-se com uma gengivite simples e progride para o restante da cavidade oral. Lábios, língua e palato também podem ser acometidos. Pode ser observadas também ulcerações, presença de proliferação tecidual e até lesões dentárias reabsortivas (LYON, 2005; MATILDE et al. 2013; NIZA; MESTRINHO; VILELA, 2004; THOMAS et al., 2017).

O diagnóstico pode ser baseado na apresentação clínica e sinais clínicos da doença. Gatos acometidos apresentam dor moderada a severa na

cavidade oral, halitose, ptialismo, diminuição da atividade de auto-limpeza (*grooming*), hiporexia, perda de peso, desidratação, irritabilidade, comportamento restritivo e de isolamento, e diminuição da atividade. A qualidade de vida pode estar tão afetada que os tutores preferem optar pela eutanásia (WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016).

É importante a utilização de exames complementares para confirmar o diagnóstico da doença, pois a GCF possui como diagnósticos diferenciais doença periodontal severa; tumores, como por exemplo, o carcinoma de células escamosas; o complexo granuloma eosinofílico, também comum em felinos; afecções auto-imunes como *penfigus vulgaris*, lupus eritematoso, vasculite por hipersensibilidade, eritema multiforme, necrose epidérmica tóxica; doenças de origem endócrinas e metabólicas como diabetes mellitus, doença periodontal secundária ao hipotireoidismo; ou até mesmo com a gengivite urêmica (LOMMER, 2013; LYON, 2005; NIZA; MESTRINHO; VILELA, 2004; WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016).

O exame histopatológico é o exame de escolha para se chegar ao diagnóstico definitivo da GCF (LYON, 2005; WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016). Histologicamente pode ser observado um infiltrado inflamatório em submucosa composto inicialmente por linfócitos. Conforme a severidade da lesão aumenta, há o comprometimento dos tecidos adjacentes, com perda do tecido epitelial e áreas de tecido de granulação imaturo intenso composto predominantemente de plasmócitos, mas também linfócitos, neutrófilos, assim como macrófagos (LYON, 2005; HARLEY; GRUFFYDD-JONES; DAY, 2011).

Como a GCF está relacionada a um desequilíbrio no sistema imunológico, o tratamento conservativo inclui drogas que possam regular a resposta imune (LYON 2005). Alguns fármacos têm sido relatados para o tratamento da doença, variam desde antibióticos, como a azitromicina e o metronidazol, que visam controlar a proliferação bacteriana da cavidade oral; até drogas imunossupressoras, como a ciclosporina, e os corticosteróides, estes, mais comumente utilizados (WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016). Adicionalmente, os quimioterápicos, como crorambucil e a vincristina. E os

imunomoduladores como interferons (LYON 2005) são recomendados; estes últimos, na verdade, são mais utilizados pelo efeito antiviral (GIL et al., 2013). Contudo, todas essas medicações podem propiciar um controle significativo, mas não necessariamente determinam a cura da doença (BELLEI et al., 2008; LYON 2005).

O tratamento cirúrgico (exodontia dos pré-molares e molares) ainda é o tratamento de eleição (BELLEI et al., 2008). A exodontia completa ou parcial deve ser considerada quando há doença periodontal adjacente (LYON 2005 ; WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016). Em revisão sistemática, os autores concordam que a extração dentária é o tratamento padrão, mas apresenta uma taxa de remissão completa da doença somente de 28,4% dos casos, o que é considerado muito baixo (WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016). Sendo assim, ainda não existe uma terapia que apresente resultados de forma adequada e convincente para alcançar uma taxa de remissão clínica de 100%. Portanto, quanto mais conhecimento a respeito da imunopatogenia desta doença, maior o potencial para se descobrir tratamentos mais eficazes (WINER; ARZI; VERSTRAETE, 2016).

Para a ativação dos linfócitos T, é necessária a ligação entre o linfócito através de receptores TCR com moléculas MHC contendo peptídeos antigênicos das células apresentadoras de antígenos (APC). O resultado desta interação é influenciado por moléculas sinalizadoras co-estimuladoras positivas e negativas (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007). O PD-1 (do inglês *Programmed Cell Death-1*) ou CD279 é um receptor membro da família B7-CD28 (SHARPE et al., 2007) e exerce suas funções de acordo com a disponibilidade dos seus ligantes PDL-1 (CD273 ou B7-H1) e 2 (CD274 ou B7-DC) expressos nas células inflamatórias presentes no microambiente tecidual (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007; FIFE; BLUESTONE, 2008).

O PD-L1, por sua ampla distribuição, é o ligante mais importante para o receptor PD-1 (IWAI et al. 2003). É expresso em linfócitos T, APC, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, queratinócitos, ou seja, basicamente o PD-L1 é expresso constitutivamente por órgãos

parenquimatosos não linfóides, em vários tecidos como coração, placenta, músculo esquelético e pulmão, mas não no intestino delgado. (FREEMAN et al., 2000; YAMAZAKI et al., 2002). O PD-L1 é expresso também em células endoteliais (MAZANET; HUGHES, 2002; POBER et al., 2017).

Diretamente vinculada à resposta aos diferentes antígenos, encontra-se também a habilidade de regulação dos linfócitos T. As células T CD4⁺ reguladoras ou Treg desempenham um importante papel como mediadoras na imunossupressão (GERMANIDIS et al., 2013). Estas células suprimem a ativação, a proliferação e a função efetora dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e, possivelmente, das células NK, linfócitos B e células dendríticas (CRUVINEL et al., 2008). Para exercerem sua função, as células Tregs apresentam a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , além da capacidade de indução de supressão mediada por contato célula a célula (CRUVINEL et al., 2008). São caracterizadas pela co-expressão da cadeia α do receptor da Interleucina 2 (CD25), entre outros, e principalmente do fator de transcrição nuclear FoxP3 (LOCKETT et al., 2010). O FoxP3 é uma molécula guia para a função das células Tregs (MILLER et al., 2015), sendo sua expressão essencial para manutenção e função destas células (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Até o momento, sabe-se que a GCF é um processo inflamatório local e destrutivo, através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (HARLEY et al., 1999; HARLEY; GRUFFYDD-JONES; DAY, 2011). Diferentes estudos tentam elucidar os mecanismos de etiopatogenia da GCF. Por meio de imuno-histoquímica, foi detectado um maior número de linfócitos T CD8+ do que CD4+ em lesões de gatos com a doença, o que caracterizaria uma resposta imune mediada por células citotóxicas do tipo Th1, consistente com uma etiologia viral (HARLEY; GRUFFYDD-JONES; DAY, 2011).

Dolieslager et al. (2013) em estudo sobre a influência da flora bacteriana oral, receptores do tipo TOLL e citocinas inflamatórias, encontrou alta expressão gênica do TNF- α , IFN- γ , IL1- β e IL-6, ou seja, uma mistura de respostas Th1 e Th2, enquanto que em estudo anterior conduzido por Harley et al. (1999), gatos com GCF apresentaram maior expressão de IFN- γ , IL-2, IL-12 e IL-10.

Uma alta prevalência de *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* foi relatada em gatos acometidos com GCF quando comparados com gatos saudáveis, como resultado do desequilíbrio da diversidade microbiológica da flora oral (DOLIESLAGER et al., 2011). Outra bactéria, a *Tannerella forsythia*, também foi incriminada como agente responsável por estimular o sistema imune de gatos predispondo os mesmos à enfermidade. Neste estudo, foi encontrada aumento da expressão gênica dos TLRs-2 e 7, demonstrando a correlação com a presença da bactéria *Tannerella forsythia* e também com a infecção viral por FCV (DOLIESLAGER et al., 2013).

Já no que diz respeito ao perfil de imunoglobulinas, análises histopatológicas e imunohistoquímicas demonstraram que conforme as lesões progridem em severidade, há um aumento do infiltrado inflamatório misto, com predominância de plasmócitos CD79+ que exibem um isotipo IgG (HARLEY et al., 1999). Fato este provavelmente reflexo da resposta adaptativa contra o

estímulo antigênico constante por agentes bacterianos residentes na cavidade oral (LYON 2005).

Atualmente não há estudos sobre a expressão do PD-1 e do seu ligante PD-L1, ou sobre os linfócitos Tregs em gatos com CGF.

Como o PD-1 tem um papel essencial como regulador negativo da resposta periférica dos linfócitos T contra antígenos próprios e não próprios, é regulador importante em doenças auto-imunes assim como em infecções crônicas (FOLKL et al., 2010), devido à sua forte ação supressora, uma alta expressão de PD-1 pode comprometer a resposta das células T contra doenças malignas ou infecções virais (TERAWAKI et al., 2011).

Inicialmente, acreditava-se que o PD-1 possuía caráter exclusivamente inibitório da atividade dos linfócitos T. Contudo, já se sabe que o PD-1 não está somente ligado ao controle da atividade dos linfócitos T, mas também a uma forma de tolerância periférica descrita como um estado de não-resposta ou anergia (FIFE; BLUESTONE 2008). Desta forma, em doenças crônicas virais, o PD-1 induziria a supressão da resposta citotóxica antiviral dos linfócitos T CD8+, como se estas células entrassem em um estado de “exaustão”, resultando na persistência da infecção, como ocorre com o HIV (FIFE; BLUESTONE, 2008), assim como com a FIV e até mesmo a PIF em gatos (ACHLEITNER et al., 2011; FOLKL et al., 2010; HARUN et al., 2013).

A expressão de PD-1 se relaciona diretamente com a presença de linfócitos Tregs no micorambiente tecidual periférico. Um aumento da expressão do PD-1 nas vias de sinalização bioquímica, promovem a geração de células iTreg por meio de múltiplos mecanismos, sendo: a) suprimindo a ativação da via de sinalização Akt, o PD-1 promove a expressão Foxp3; b) inibindo a cinase dependentes de ciclina - 2, o PD-1 aumenta a trans-ativação do Smad3 mediada por TGF- β , e promovendo assim a transcrição do Foxp3; e c) suprimindo a glicólise e promovendo a oxidação de ácidos graxos, o PD-1 ativa especificamente um programa metabólico que promove a geração de células Treg (BOUSSIOTIS; CHATTERJEE; LI, 2014).

2.1 Justificativa e objetivo geral

Tendo em vista que a maioria dos estudos em medicina felina sobre a expressão do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 são realizadas no contexto de doenças virais crônicas e, até o momento, não há pesquisas sobre a expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 associados à lesão em gatos com gengivoestomatite crônica, o objetivo principal do presente estudo é avaliar a expressão gênica destes moduladores da resposta imune.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o perfil dos felinos com a doença e avaliar a correlação entre as informações obtidas e a GCF.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais e ética em experimentação animal

Todos os procedimentos do estudo foram executados de acordo com protocolo aprovado no comitê de ética da instituição CEUA, FOA/UNESP nº 00141-2018 (Anexo A).

O estudo foi composto por 14 gatos escolhidos por conveniência que incluíam machos e fêmeas, adultos, de um ano a 10 anos de idade. Não houve critério de seleção de raça, mesmo que os nossos gatos locais de pelo curto sejam reconhecidos internacionalmente pela *World Cat Federation* desde 1998 como “Brazilian Shorthair”, no presente estudo os gatos foram categorizados como sem raça definida (SRD) pela ausência de pedigree.

Do total de 14 gatos, sete apresentavam sinais clínicos e histórico de surgimento de lesões em cavidade oral decorrentes de gengivostomatite crônica, compondo assim o grupo doente. Esses animais foram encaminhados por um veterinário responsável por uma organização não governamental protetora de animais.

O grupo controle foi composto por outros sete felinos sem lesões em cavidade oral, ao exame físico normais, que estavam sendo submetidos ao procedimento de esterilização (castração) em centros cirúrgicos do município de Araçatuba - SP. Por esta razão, o protocolo anestésico utilizado variou de acordo cada local. Esses animais, muitas vezes eram sem tutores, recolhidos para serem esterilizados e posteriormente devolvidos para seu habitat natural. Então, não foi possível obter informações acerca do manejo, dieta, vacinação e ambiente. Sendo possível somente concluir que tinham vida livre.

Um termo de consentimento foi assinado previamente e as informações sobre o perfil de cada felino foram coletadas através de entrevista direta com os tutores responsáveis. Para tal, foi elaborada uma ficha de anamnese contendo as seguintes informações:

- Resenha do animal: sexo, idade e raça;

- Manejo: dieta, vacinação, ambiente, acesso à rua;
- Histórico: tempo aproximado de surgimento das lesões e evolução;
- Avaliação do aspecto clínico da(s) lesão(s) - *score*;
- Tratamento prévio: antibiótico, corticóide, extração dentária;
- Resultado teste rápido FIV/FeLV/PIF;
- Resultado PCR para Herpesvirus e Calicivirus;
- Resultado bioquímico (albumina, creatinina, proteína total e ureia).

O respectivo modelo da ficha se encontra anexado na lista de apêndices ao final do projeto (Anexo B).

3.2 Coleta das amostras

Previamente ao procedimento de coleta das amostras de mucosa da cavidade oral, foram coletadas amostras de sangue para a realização de hemograma e análise bioquímica para verificação da função renal através da dosagem de uréia e creatinina de todos os animais, assim como da proteína total e albumina, para verificação da proporção albumina/globulina especificamente para os gatos com GCF. O acesso venoso foi através da veia cefálica, sendo colhidos aproximadamente 1mL de sangue e armazenado em tubo *vacutainer* sem EDTA, refrigerado a 4°C, e encaminhado em menos de 24 horas a um laboratório de patologia clínica para respectiva análise.

A partir do soro, foi feita triagem de todos os animais positivos para FIV, FeLV e FCoV, para tal foi utilizado o teste rápido SNAP Combo FeLV Antigen/FIV Antibody Test Kit (IDEXX, Maine, EUA), com sensibilidade de 93% e especificidade de 100% pra FIV, e com sensibilidade de 98,6% e especificidade de 98,2% pra FeLV; enquanto que para a detecção dos níveis de IgG contra FCoV foi utilizado o ImmunoComb Feline Coronavirus (FCoV) Antibody Test Kit (Biogal – Galed Labs, Israel), com sensibilidade de 100% e especificidade de 100% pra FCoV.

Para coleta das amostras de mucosa oral dos gatos com GCF foi instituído o protocolo anestésico composto pela combinação de acepromazina 0,2% na dose de 0,02mg/Kg, via intramuscular, para tranquilização e analgesia, e o cloridrato de zolazepam com o cloridrato de tiletamina 100mg, sob nome comercial Telazol®, na dose de 3mg/Kg, também via intramuscular, para a anestesia geral (GRIMM et al., 2015).

Com o animal sedado, a cavidade oral dos gatos com GCF foi avaliada de acordo com o aspecto clínico da lesão, em que se é observado o grau de severidade da lesão de acordo com a classificação proposta por Tenorio et al. (1991). Nesta classificação é dada uma pontuação de acordo com um *score* clínico.

Tabela 1 – Score clínico para avaliação da cavidade oral de gatos com gengivoestomatite crônica.

| | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | Aparência normal da mucosa oral |
| 1 | Vermelhidão na gengiva (gengivite), caracterizada por uma linha vermelha ao redor da base do dente, sem ulceração |
| 2 | Gengivite mais grave com proliferação de tecidos e exsudação |
| 3 | Doença gengival/periodontal e ulceroproliferativa com lesões no palato, fauces, bochechas e/ou língua |

Para a colheita das amostras de mucosa oral de todos os animais, foi realizada biópsia incisional a partir da região adjacente aos pré-molares superiores ou inferiores de acordo com a presença de lesão no local. Foi colhido um fragmento de tamanho aproximado de 1cm³ com a utilização de pinça e bisturi, que, então, foi dividido em duas partes. Uma foi fixada em formalina 10%, pH 7,4, para processamento histopatológico, e a outra parte mantida em RNALater (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) a 4°C durante 24 horas de acordo com instruções do fabricante.

Para detecção de animais portadores de FCV e FHV-1, foram coletados *swabs* orofaríngeos profundos. Estes *swabs* foram mantidos a -20°C e encaminhados para um laboratório externo de patologia clínica e biologia molecular para execução de RT-PCR.

3.3 Análise histopatológica

Os fragmentos de mucosa oral foram embebidos em parafina e seccionados com 5µm de espessura. Posteriormente, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina e tricromo de Masson para análise microscópica.

Os cortes foram avaliados de acordo com a classificação proposta por Harley, Gruffydd-Jones e Day (2011) onde é observado o grau de infiltrado inflamatório. Desta forma, os cortes podem ser classificados em:

- grau 0 ou normal, em que se observa o epitélio estratificado escamoso com presença de alguns linfócitos intra epiteliais esparsos, assim como linfócitos e mastócitos na região da lâmina própria/submucosa, podendo formar pequenos agregados;
- grau 1 com inflamação mínima a leve, em que se observa hiperplasia e paraqueratose variáveis, podendo ter um aumento do número de linfócitos intra epiteliais e alguns neutrófilos esparsos, a região da lâmina própria/submucosa pode estar espaçada, e populações de plasmócitos, linfócitos, mastócitos e raros macrófagos podem ser vistos no interstício e área perivascular;
- grau 2 com inflamação moderada, em que se observa hiperplasia epitelial variada com regiões de degeneração e ulceração, leve a severo número de linfócitos intra epiteliais juntamente com macrófagos e neutrófilos, a lâmina própria/submucosa contém infiltrado inflamatório moderado composto por linfócitos, plasmócitos, e um número variável de macrófagos e neutrófilos, as células inflamatórias podem formar uma área "liquenóide" distinta dentro da lâmina própria e na submucosa, e as células geralmente se estendem ao redor das fibras musculares esqueléticas;

- grau 3 com inflamação severa é caracterizada por áreas extensas de degeneração epitelial, espongirose e ulceração com exudação superficial e muitos macrófagos, neutrófilos e linfócitos, a lâmina própria/submucosa contém um infiltrado inflamatório denso composto por proporções variadas de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos, podendo apresentar em algumas áreas da lâmina própria a mesma expandida ou substituída por tecido imaturo de granulação com debris necróticos.

3.4 Imuno-histoquímica para detecção de FCoV

Também foi realizada imuno-histoquímica para detecção do FCoV, vírus causador da PIF, nas amostras dos gatos do grupo doente, exceto do gato nº 2 que durante a confecção das lâminas, devido ao tamanho do fragmento, houve a perda do material. Os demais cortes foram incluídos em lâminas silanizadas, submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 98°C por 15 minutos. Etapas subsequentes de lavagens com PBS1x, bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 5% foram realizadas. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti Coronavírus (diluição 1:100, coelho anti mouse, clone FIPV3-70, Thermo Fisher Scientific, Sao Paulo, Brazil). Então, o anticorpo secundário foi aplicado (MP-7500, anti-mouse/rabbit IgG, Vector Labs). O complexo antígeno anticorpo foram revelados com solução diaminobenzidina (DAB, DAKO, California, USA) por 1 minuto. Por fim, os cortes foram corados com hematoxilina de harris e as lâminas foram montadas. Foi utilizada amostra de baço como controle positivo para coronavírus felino (DA MATTA, 2018). O controle negativo consistiu da mesma amostra controle positivo, porém, nesse caso, o anticorpo primário foi substituído por solução PBS1x. AS lâminas foram validadas com objetivas de 40x em microscópio de luz (Olympus Bx43), e a positividade para FCoV pode ser observada na cor marrom.

3.5 Extração do RNA e síntese do cDNA

Para a extração do RNA foi utilizado o kit *mirVana*® (Ambion RNA by Life Technologies, CA, EUA) e para a síntese do cDNA o QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Quiagen), ambos de acordo com as instruções dos fabricantes. O produto da extração de RNA foi submetido à análise de concentração e de qualidade através de espectrofotômetro e mantido a -80°C, enquanto que o cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C para PCR em tempo real (RT-PCR).

3.6 Ensaio de RT-PCR

Para a reação de amplificação foi preparada solução utilizando o 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR SuperMix (Solis BioDyne, Estônia, UE) com volume final de 20µL contendo 4µL de supermix, 12,7µL de água ultrapura, 2,5µL de cDNA da amostra e 0,4µL de cada iniciador (*primers forward e reverse*) na concentração de 100nM, de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação das reações foi feita em duplicata em termociclador seguindo as condições estabelecidas pelo fabricante com algumas modificações, em que foi feita desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos; desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 56°C por 20 segundos para os genes PD-1, PD-L1, FoxP3 e YWHAZ, a 58°C por 20 segundos para o gene RPL-17, e a 60°C por 20 segundos para o gene HPRT, extensão a 72°C por 20 segundos; repetidamente por 45 ciclos. Ao final, foi gerada uma curva de *melting* variando de 65°C a 95°C com aumento de temperatura de 0,1°C/segundo.

Os genes YWHAZ, RPL-17 e HPRT foram utilizados como genes de referência (*housekeeping*) de acordo com Penning et al. (2007).

Tabela 2 - Sequências de *primers* utilizados para quantificação gênica do PD-1, PD-L1, FoxP3 e dos genes de referência nas amostras de gatos com GCF e gatos saudáveis por RT-PCR.

| Gene | Forward (5'-3') | Reverse (5'-3') |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| PD-1 ^{a,b} | GAGAACGCCACCTTCGTC | TGGGCTCTCATAGATCTGCGT |
| PD-L1 ^{a,b} | CGATCACAGTGTCCAAGGACC | TCCGCTTATAGTCAGCACCG |
| FoxP3 ^{b,c} | GCCTGCCACCTGGAATCAAC | GTGTGCTGGGGCTTGGGA |
| YWHAZ ^d | GAAGAGTCCTACAAAGACAGCACGC | AATTTTCCCCTCCTTCTCCTGC |
| RPL-17 ^d | CTCTGGTCATTGAGCACATCC | TCAATGTGGCAGGGAGAGC |
| HPRT ^d | ACTGTAATGACCAGTCAACAGGGG | TGTATCCAACACTTCGAGGAGTCC |

a- FOLKL et al., (2010); b- ACHLEITNER et al., (2011); c- LANKFORD et al. (2009) e d- PENNING et al. (2007).

Fonte: Elaborada pela autora

3.7 Análise da expressão gênica

Após o ensaio de RT-PCR, foi utilizado o método de análise quantitativa relativa a partir dos valores detectados pelo acúmulo de sinal fluorescente (Ct) e calculados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN 2001), utilizando-se do *software* Microsoft Excel.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados com estatística descritiva e inferencial. Sendo testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal foi realizado o teste de Mann Whitney e para as variáveis com normalidade foi realizado o test t para comprar a expressão gênica nos grupos controle e doente. A associação entre a positividade para gengivoestomatite crônica e a presença de infecções virais foi realizada pelo teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos felinos

Dos 14 gatos do estudo, n=5 com GCF e n=6 dos saudáveis eram machos ($n_{\text{total}} = 11$), todos adultos e sem raça definida.

Do grupo doente, todos os animais eram castrados, vivam em ambiente com superlotação de felinos, com acesso à rua, se alimentavam de dieta mista composta por ração e comida caseira, e recebiam reforços anuais das vacinas tríplice felina (Rinotraqueíte, Calicivirose e Panleucopenia) e antirrábica, ambas vacinas éticas. Três gatos tinham sido tratados anteriormente com corticoide injetável (Depomedrol®) e sem sucesso ao tratamento. Nenhum animal apresentou bioquímica compatível com doença renal crônica.

Do grupo controle, um animal apresentou a ureia um pouco elevada, mas não foi observado o mesmo aumento da creatinina. Então esse aumento da ureia está associado a outros fatores de não interesse no estudo. Como este animal em específico era um animal errante, uma provável causa para esse aumento da ureia poderia ser justificado pela ausência de alimentação.

Sobre a triagem das principais viroses felinas, no grupo com CGF, dois animais apresentaram co-infecção por FIV e FHV-1, e FeLV e FCV. Cinco gatos apresentaram reação positiva para IgG contra o FCoV, sendo duas reações fortes e três medianas (Tabela 3). Do grupo controle, somente um animal apresentou positividade para FIV. Quatro gatos apresentaram reação positiva para IgG contra o FCoV, sendo uma reação forte e quatro medianas.

Sobre o aspecto clínico da lesão dos gatos com gengivoestomatite crônica, igualmente seis animais receberam *scores* 1 e 2, ou seja, três gatos exibiam gengivite e outros três, gengivite mais severa com proliferação de tecido e exsudação (Dados apresentados na tabela 3 e representação ilustrativa nas figuras 1 e 2). Apenas um gato recebeu *score* 3, com acometimento da região glossopalatina (Figura 3).

Tabela 3 – Dados sobre a análise clínica (score), grau histopatológico das lesões orais, resultados da triagem das principais infecções virais e função renal de gatos com GCF.

| Gato | Score clínico | GrauHisto patológico | FIV | FeLV | FHV-1 | FCV |
|------|---------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 2 | 3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 2 | 1 | 0 | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo |
| 3 | 1 | 2 | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 4 | 2 | 0 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 5 | 2 | 2 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6 | 3 | 3 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 7 | 1 | 0 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |

| Gato | Reação IgG FCoV | Proteína sérica g/dL (6,0-8,0) | Albumina/ Globulina | Ureia mg/dL (42,63 - 64,01) | Creatinina mg/dL (0,8-1,8) |
|------|-----------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | Forte | 10,0 | 0,3 | 51,0 | 1,4 |
| 2 | Mediana | 9,0 | 0,7 | 42,0 | 0,8 |
| 3 | Mediana | 8,4 | 0,3 | 44,0 | 1,7 |
| 4 | Fraca | 8,2 | 1,8 | 42,0 | 1,0 |
| 5 | Forte | 9,2 | 0,7 | 44,0 | 0,9 |
| 6 | Mediana | 9,8 | 0,2 | 43,0 | 1,0 |
| 7 | Fraca | 8,4 | 0,4 | 61,0 | 1,5 |

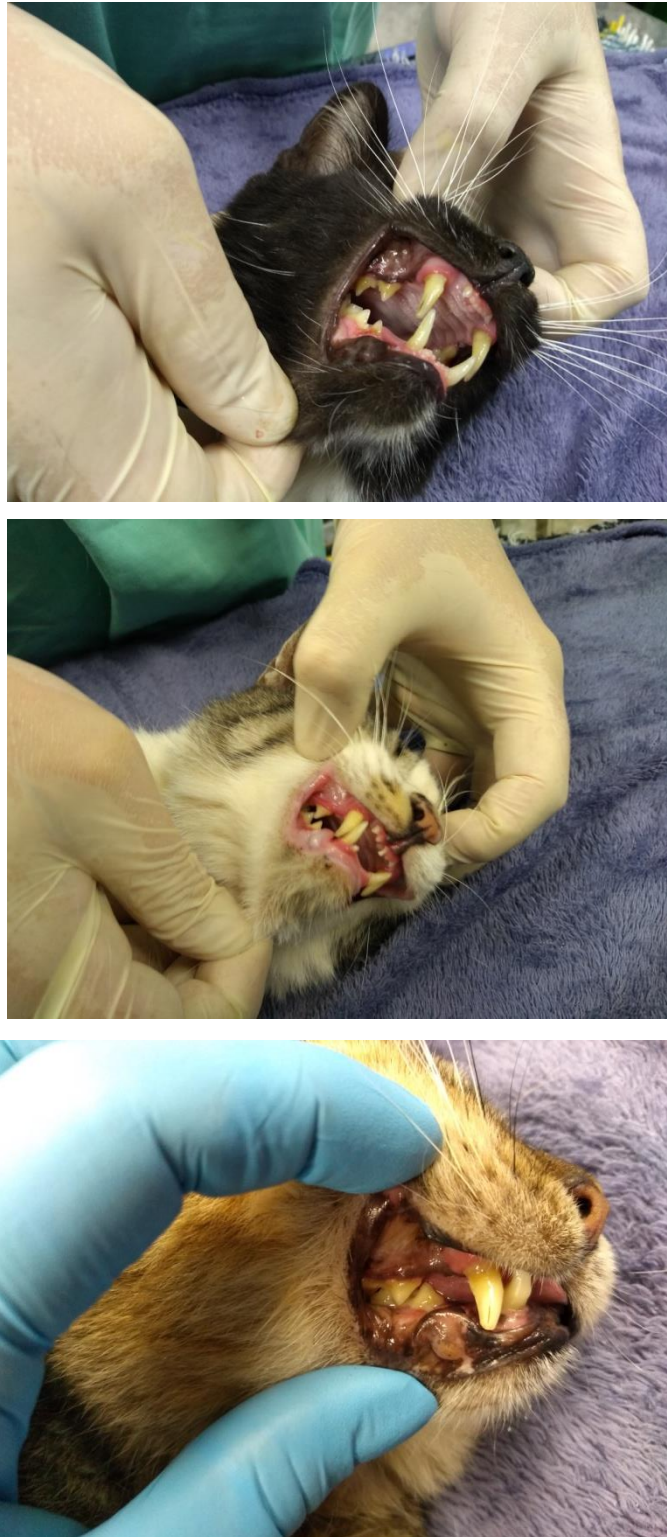


Figura 1 - Fotografias ilustrando os gatos n° 2, 3 e 7 que receberam score clínico 1 na avaliação do aspecto clínico da gengivoestomatite crônica (Dados apresentados na tabela 3).

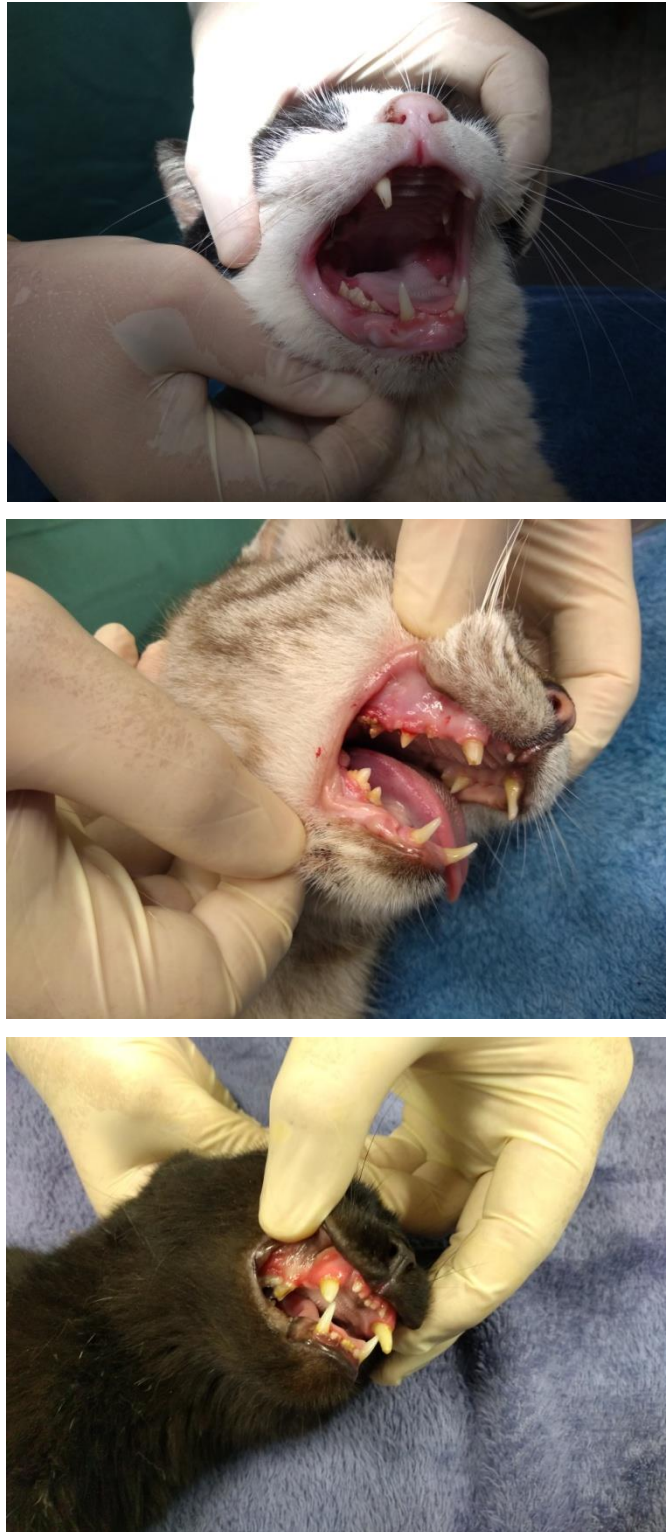


Figura 2 - Fotografias ilustrando os gatos n° 1, 4 e 5 que receberam score clínico 2 na avaliação do aspecto clínico da gengivostomatite crônica (Dados apresentados na tabela 3).

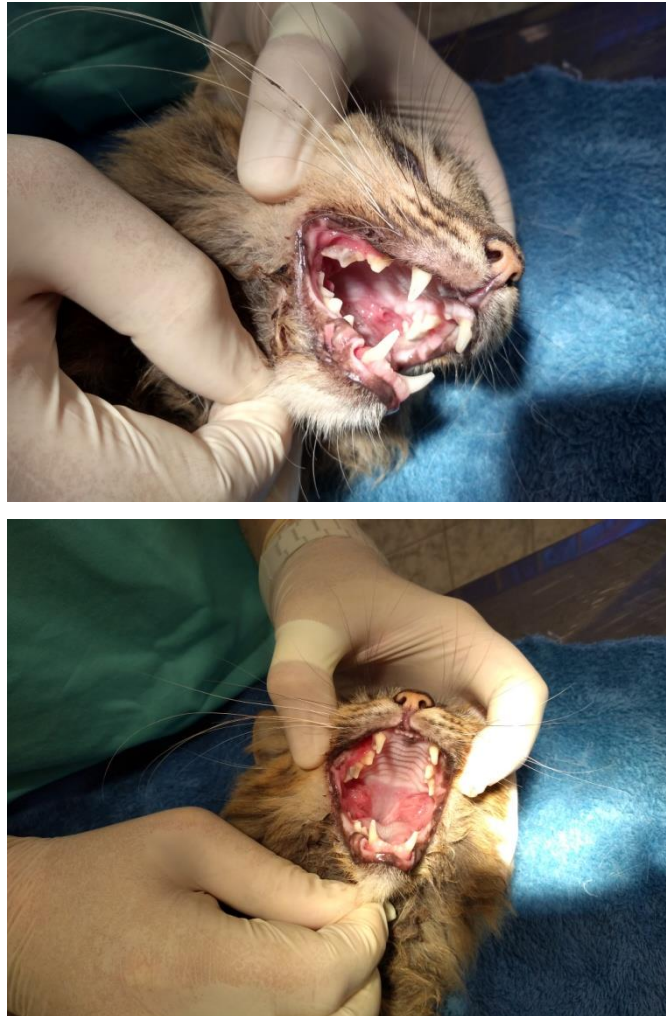


Figura 3 - Fotografias em diferentes ângulos do gato nº 6 que recebeu score clínico 3 na avaliação do aspecto clínico da gengivoestomatite crônica (Dados apresentados na tabela 3).

4.2 Análise Histopatológica

Microscopicamente, puderam ser observadas grande parte das características da graduação proposta por Harley, Gruffydd-Jones e Day (2011), sendo três fragmentos de mucosa oral classificados com grau 0, dois com grau 2 e outros dois com grau 3 (Dados mostrados na tabela 2). No grau 0, foram observados apenas linfócitos esparsos em submucosa, sem formação de agregados. No grau 2, foram observadas hiperplasia epitelial, infiltrado inflamatório moderado composto por linfócitos e plasmócitos formando a

referida área "liquenóide" distinta dentro da lâmina própria e na submucosa (Figura 4). Enquanto que no grau 3, foram observadas áreas extensas de degeneração epitelial, ulceração com exudação superficial, infiltrado inflamatório denso composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos, perda das características da lâmina própria com presença de debris necróticos (Figuras 5 e 6).

Em dois gatos foram observadas correspondências entre a avaliação da severidade clínica da lesão e o grau de inflamação à análise histopatológica, duas avaliações clínicas se mostraram inferior aos achados histopatológicos e em três os achados histopatológicos evidenciaram uma inflamação maior do que à avaliação clínica.

À coloração de tricromo de Masson não foi observada áreas de tecido imaturo ou de regeneração. Abaixo, exemplos dos achados de histopatologia no presente estudo.

4.3 Imuno-histoquímica

Não foi observada marcação para FIPV nas amostras de biópsias. No controle positivo, foi observada marcação para FIPV no citoplasma dos macrófagos infectados. No controle negativo, não foi observada marcação (dados não mostrados).

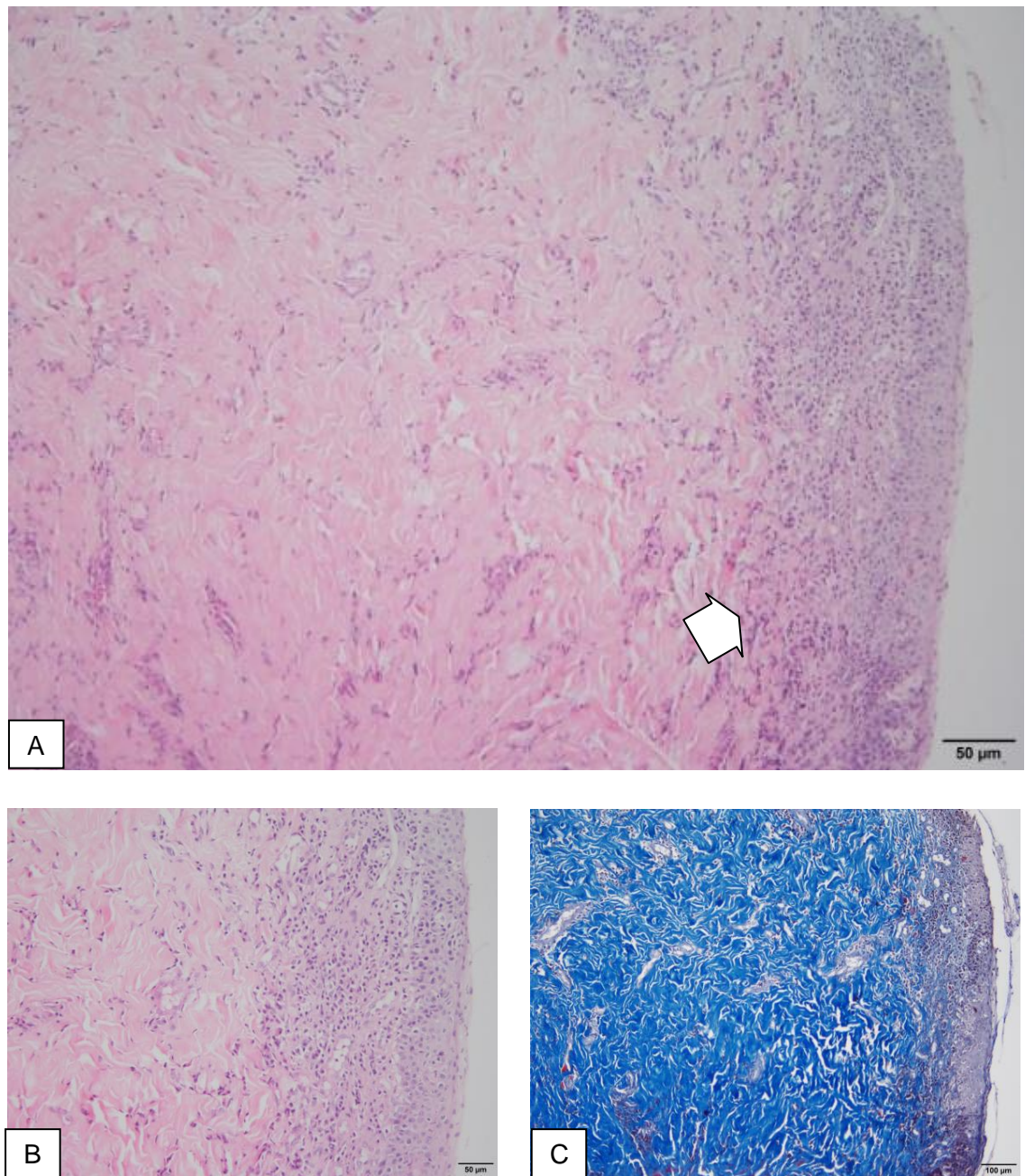


Figura 4 - Fotomicrografias do fragmento de mucosa oral do gato nº 3, um exemplo de grau 2 à classificação histopatológica, onde se observa inflamação moderada, regiões de degeneração e ulceração, com infiltrado inflamatório moderado formando áreas “liquenóides” (seta) na lâmina própria/submucosa. Em A e B- HE (10x e 40x, respectivamente); em C- Tricromo de Masson(40x).

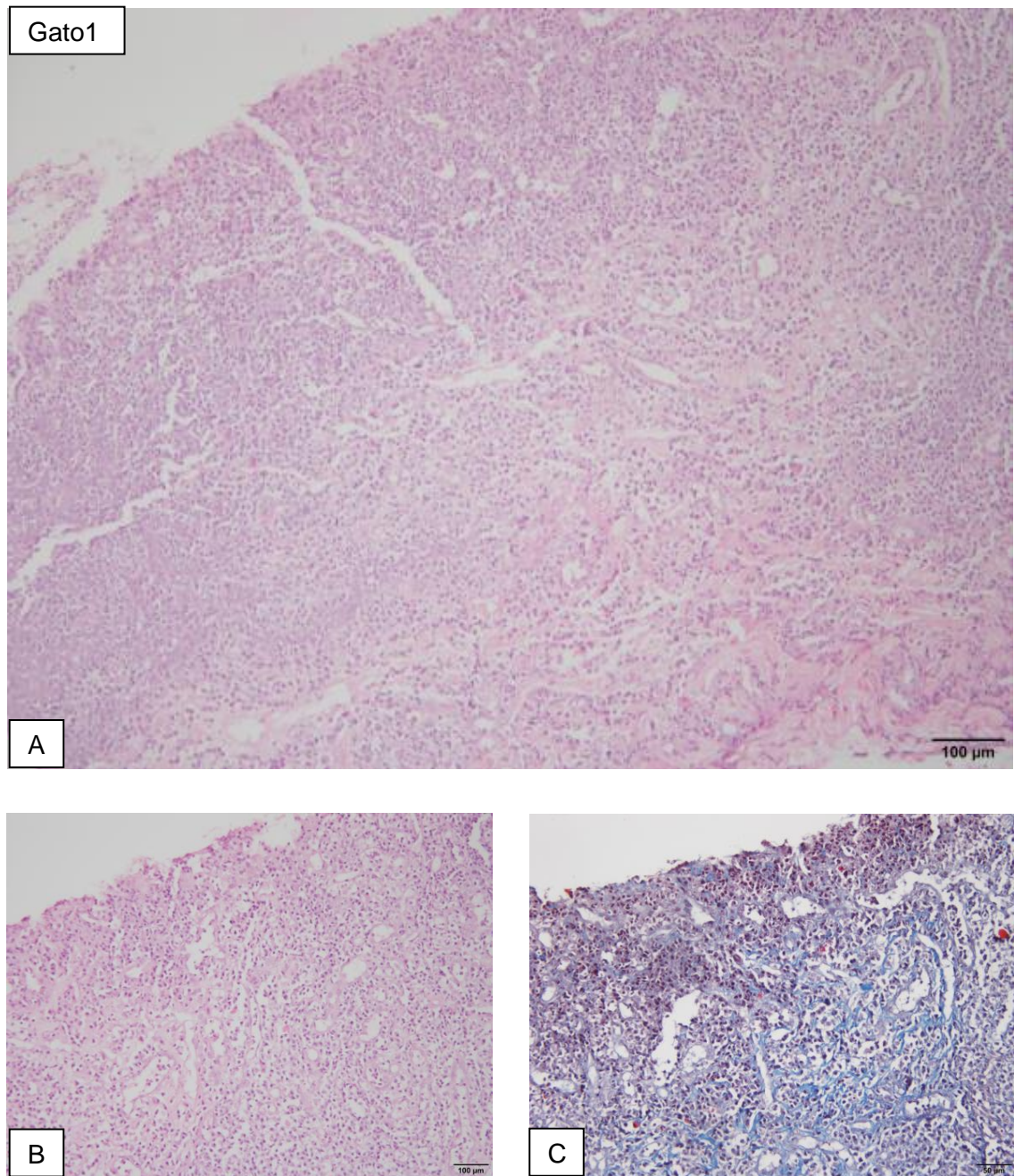


Figura 5 - Fotomicrografias dos fragmentos de mucosa oral do gato n° 1, que à classificação histopatológica recebeu grau 3 de inflamação severa, no qual se observa inflamação severa com áreas extensas de degeneração epitelial, infiltrado inflamatório denso na lâmina própria/submucosa, com áreas de expansão da lâmina própria. Em A e B- HE (10x e 40x, respectivamente); em C- Tricromo de Masson (40x).

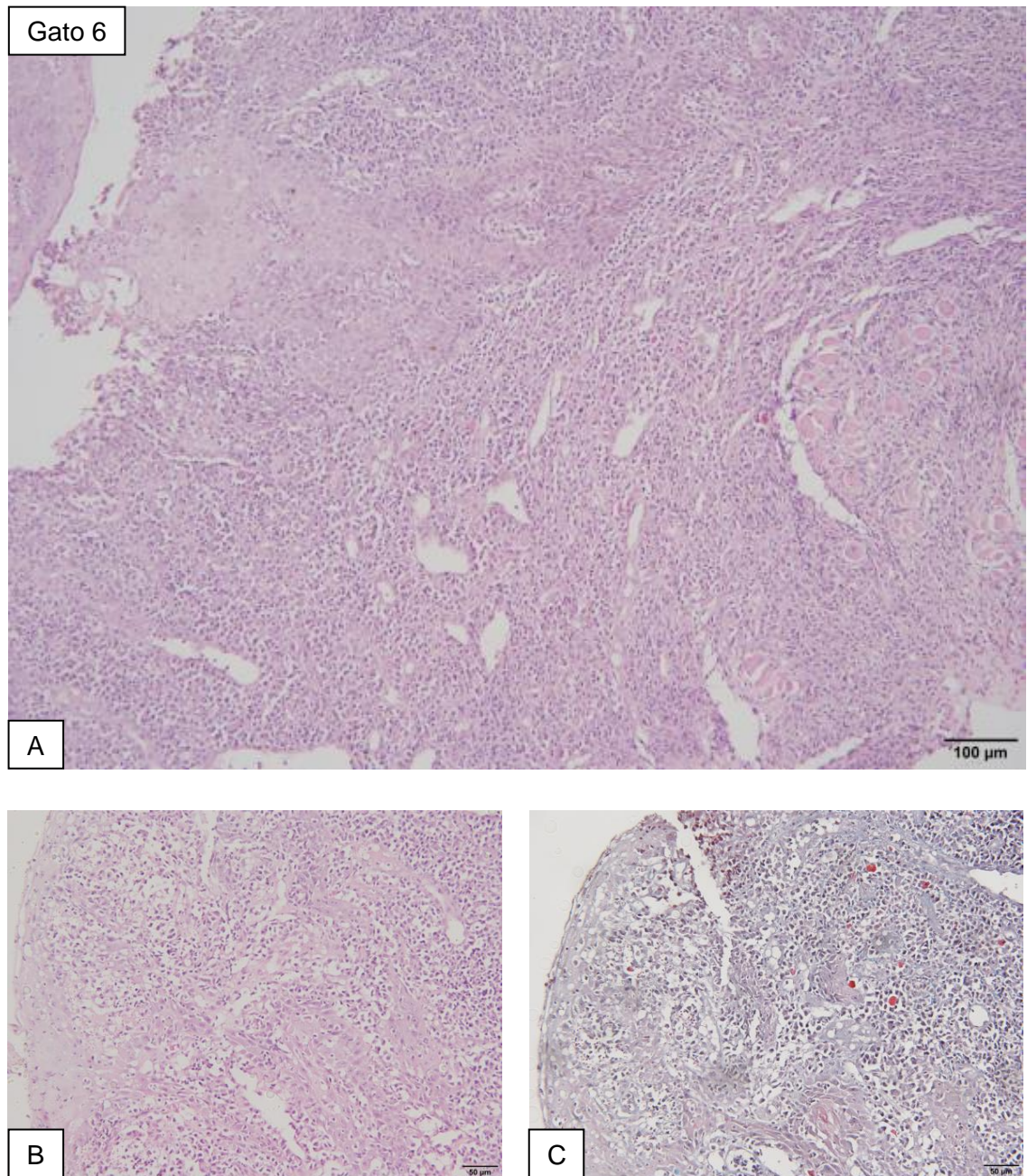


Figura 6 - Fotomicrografias dos fragmentos de mucosa oral do gato n° 6, que à classificação histopatológica também recebeu grau 3 de inflamação severa, no qual se observa inflamação severa com áreas extensas de degeneração epitelial, infiltrado inflamatório denso na lâmina própria/submucosa, com áreas de expansão da lâmina própria. Em A e B- HE (10x e 40x, respectivamente); em C- Tricromo de Masson (40x).

4.4 Ensaio de RT-PCR

Todas as amostras dos gatos com gengivoestomatite crônica assim como os saudáveis expressaram os genes para PD-1/PD-L1 e FoxP3 (Figura 7). Os gráficos com as respectivas amplificações estão dispostos a seguir e as curvas de *melting* estão disponibilizadas na lista de apêndices (Apêndice A).

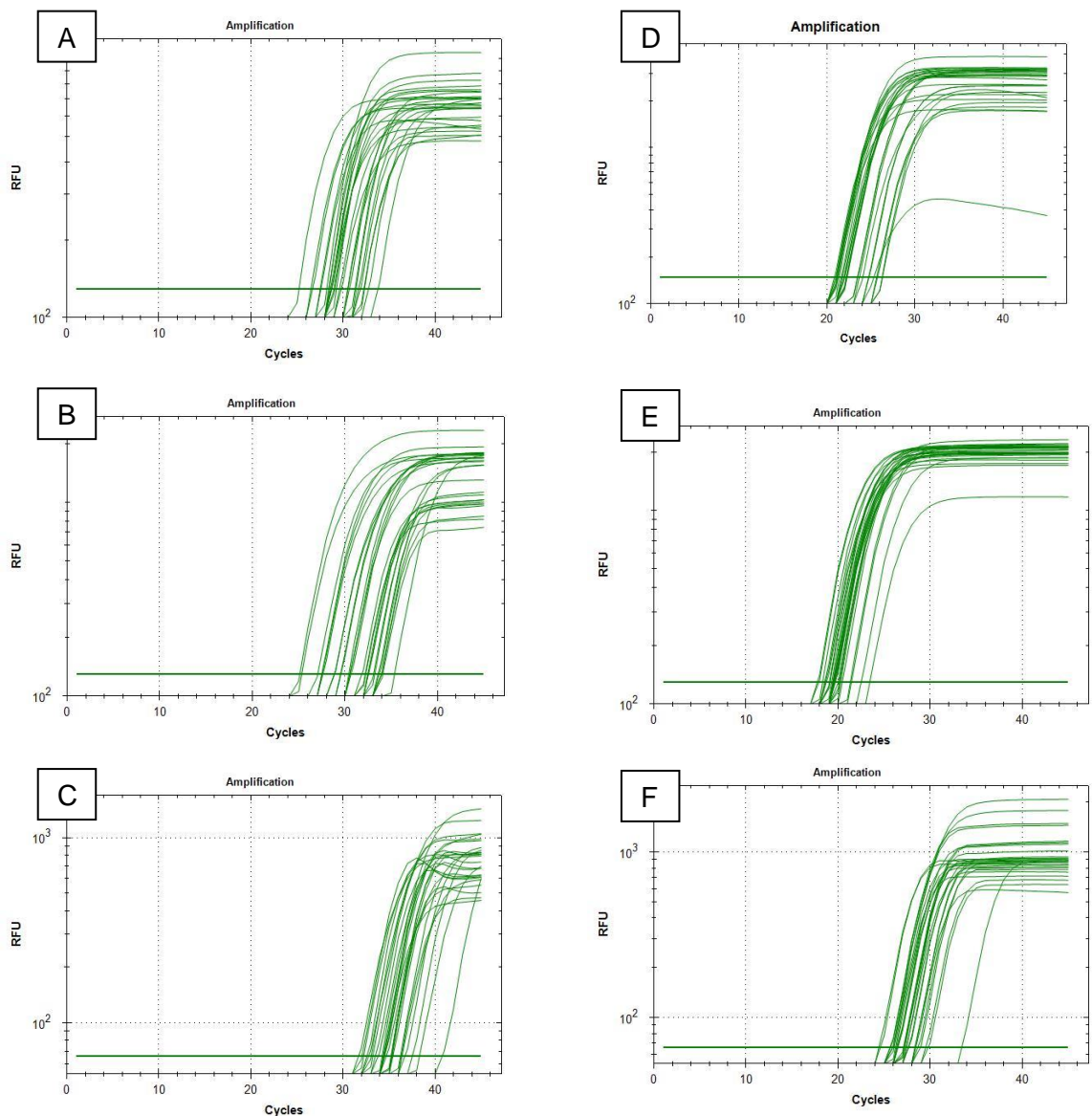


Figura 7 - Gráficos de amplificações do genes PD-1(A), PD-L1(B), FoxP3(C), YWHAZ(D), RPL17(E) e HPRT(F), em gatos com gengivoestomatite crônica e em gatos saudáveis.

4.5 Resultados da expressão gênica e estatísticos

Foi encontrado que a expressão gênica do PD-L1 do grupo de gatos doentes mostrou diferença significativa em relação ao grupo de gatos saudáveis ($P < 0,05$) (Apêndice A). Não foram encontradas associações entre as principais infecções virais por FIV, FeLV, FCV, FHV-1 e FCoV com a gengivostomatite crônica (Apêndice D).

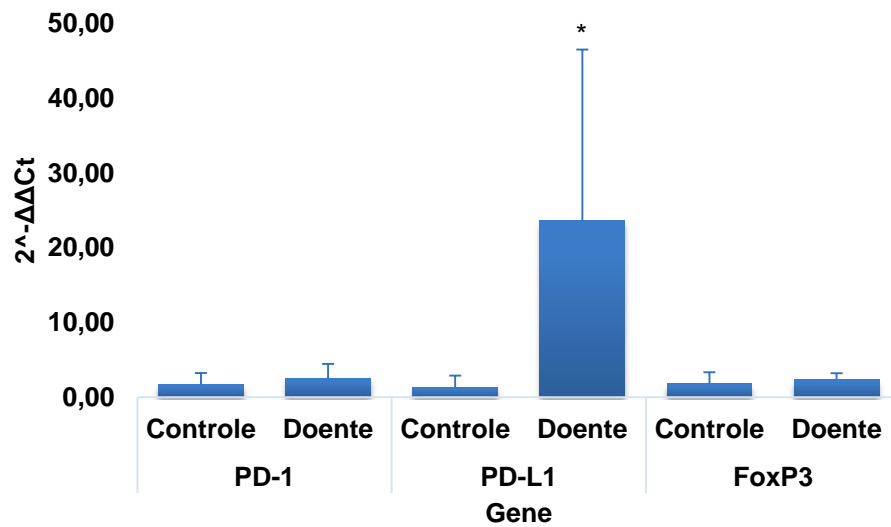


Figura 8 – Gráfico com a média e desvio padrão dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos grupos controle e doente de acordo com os genes PD-1, PD-L1 e FoxP3. Observar aumento significativo da expressão do PD-L1 quando comparado ao grupo controle. *Teste de Mann Whitney ($P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo sobre a expressão gênica do PD-1 e seu ligante PD-L1, e do FoxP3, em lesões de gatos com gengivoestomatite crônica.

Como já mencionado, foi encontrada alta expressão gênica do IFN- γ em gatos com GCF (DOLIESLAGER et al., 2003; HARLEY et al., 1999). O IFN- γ seria o maior indutor da expressão de PD-Ls (BROWN et al., 2003). Resultados de outros estudos mostram que o IFN- γ , e também o LPS bacteriano, induzem a um aumento da expressão de PD-L1 na superfície das células (BROWN et al., 2003; FREEMAN et al., 2000; MAZANET & HUGHES 2002; YAMAZAKI et al., 2002). Desta maneira, a microflora residente em cavidade oral constitui uma fonte de estímulo antigênico constante para a expressão de PD-L1, o que explica os resultados encontrados em gatos com GCF no presente estudo.

Por outro lado, em um experimento *in vitro*, observou-se que o PD-L1 de células endoteliais regularia negativamente a síntese de IL-2 e IFN- γ pelas células T, e possivelmente de IL-10 (MAZANET; HUGHES 2002). Brown et al., 2003 defendem que as células endoteliais, assim como monócitos, não expressariam constitutivamente o PD-L1 em suas superfícies, mas a expressão deste receptor seria rapidamente induzida pelo IFN- γ , e sinergicamente pelo IFN- γ e TNF, este último também já relatado como altamente expresso em gatos com GCF (DOLIESLAGER et al., 2013). Assim, seria interessante que estudos futuros avaliassem a relação entre a presença de IL-2 e IFN- γ e a expressão de PD-L1 em gatos com GCF.

A localização do PD-L1 contribuiria para seu papel na tolerância periférica uma vez que as células endoteliais estão localizadas na interface entre a corrente sanguínea e os sítios de inflamação, onde há a apresentação dos antígenos. Quando uma célula T efetora entra no tecido, ela primeiramente tem contato com a célula endotelial e a interação entre PD-1 do linfócito T ativado com o PD-L1 expresso pela célula endotelial pode suprimir a proliferação de linfócitos T, limitando assim a extensão da resposta imune

(FREEMAN et al., 2000; IWAI et al., 2003; MAZANET; HUGHES, 2002; MARELLI-BERG et al., 2000).

Em um estudo sobre a expressão gênica de PD-L1 no fígado, as células não parenquimatosas do fígado, incluindo células endoteliais sinusoidais e células de Kupffer, expressaram constitutivamente PD-L1 e inibiram a proliferação e divisão celular de células T ativadas que expressavam PD-1 (IWAI et al. 2003). Este estudo é bastante interessante porque o fígado é constantemente exposto a antígenos inócuos que chegam através da circulação sanguínea, o que faz dele um órgão que requer mecanismos regulatórios para evitar uma resposta imune excessiva contra esses antígenos. Esse contexto poderia ser expandido para a cavidade oral, onde há a presença da microbiota natural. A mucosa da cavidade oral é constantemente exposta a antígenos. Talvez essa seja a explicação mais plausível para a alta expressão do PD-L1 observado no presente estudo. Freeman et al., 2000 já tinham se atentado a esse possível papel do PD-L1 em outros órgãos, da sua particular importância para limitação da atividade dos linfócitos T nos locais efetores das respostas inflamatórias. Assim como uma alta expressão de PD-L1 no fígado é traduzida como um sinal negativo para o recrutamento, ativação e proliferação de linfócitos T, mecanismo pelo qual é induzida a tolerância periférica no órgão, a mesma idéia seria aplicada para os gatos com GCF.

Proporcionalmente ao PD-1, foi encontrado resultado similar quanto à expressão do FoxP3. Como já mencionado, um aumento da expressão do PD-1 também resultam num aumento de células Treg (BOUSSIOTIS; CHATTERJEE; LI, 2014). Portanto, é possível que a ausência de modulação de PD-1 na doença possa ter contribuído para os resultados encontrados para as Tregs.

No presente estudo, ao que tudo indica, a infecção viral parece não ser o gatilho desencadeador da GCF. Do total de sete gatos com GCF, cinco não eram portadores de FIV, FeLV, FCV e FHV-1, sendo que dois apresentaram positividade para co-infecções, um para FeLV e FCV (gato nº 2), e outro para FIV e FHV-1 (gato nº 3). Esses achados são similares ao de um

estudo sobre GCF e infecção por espécies de *Bartonella*, em que não foi encontrada correlação em a presença da doença e infecção pela bactéria ou FIV, FeLV, FCV ou FHV-1 (QUIMBY et al., 2008), mas são contrários à maioria dos estudos sobre GCF, em que os autores relataram associação entre lesão por GCF e infecção viral, principalmente pelo FCV (DOLIESLAGER et al., 2013; DOWERS et al., 2010; HARLEY et al., 1999; THOMAS et al., 2017).

No presente estudo, não foi possível a realização de um método diagnóstico mais sensível e preciso quanto à presença de FIV e FeLV. Embora tenha sido realizada somente a triagem dos animais portadores dessas viroses, a única virose que pode ter apresentado um resultado falso negativo é a FIV, uma vez que o teste diagnóstico limita-se à detecção de anticorpos e os animais podem ter soroconversão bastante tardia após infecção viral (CRAWFORD 2011).

Os gatos n° 2 e 3 que apresentaram positividade para co-infecções virais não receberam um *score* clínico alto como o gato n° 6, negativo para essas viroses em questão. Tenorio et al., 1991 enfatizam que a positividade para o FCV sozinho não aumenta significativamente a prevalência ou a severidade das lesões orais, mas gatos com FIV, estes sim teriam um aumento significativo na taxa de doenças orais e lesões mais severas na cavidade oral.

Já foi relatado em experimento *in vitro*, que a infecção aguda por FIV aumentou a expressão gênica do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 concomitantemente em linfócitos, sugerindo que a elevação da expressão das moléculas PD em linfócitos infectados com FIV contribui, assim, com a função imussupressora das células Tregs na infecção (ACHLEITNER; CLARK; BIENZLE, 2011). No entanto, ao se observar isoladamente os valores Cts do gato n° 3 FIV positivo, assim como do gato do grupo controle também FIV positivo, é possível constatar que a expressão dos genes PD-1/PD-L1 e FoxP3 não estavam maiores do que o restante dos grupos (Apêndice B).

Sobre o vírus relacionado com a PIF, houve maior número de animais com positividade ao teste rápido (n=5 de 7 gatos com GCF e n=4 de 7 gatos saudáveis). Do grupo doente, dois gatos apresentaram reação forte, ou

seja, grande quantidade de IgG contra o FCoV, indicando infecção pelo FCoV e com alto risco de disseminação do vírus, consistente com o diagnóstico de PIF, de acordo com manual do kit. E três gatos apresentaram reação moderada, indicando contato prévio com o FCoV ou infecção atual. Dois destes, eram os que tinham co-infecção por FeLV/FCV, e FIV/FHV-1. Esse alto índice de gatos que apresentaram reação IgG positiva contra o FCoV pode ser explicado pelo fato de que o FCoV é muito comum entre a população de gatos mundialmente, anticorpos específicos contra FCoV podem estar presentes em acima de 90% de gatos provenientes de gatis e 50% de gatos que vivem sozinhos e domiciliados (HARTMANN 2011). A PIF é o principal desafio diagnóstico de quem trabalha com felinos. A anormalidade laboratorial mais comum encontrada em gatos com a doença é a hiperproteinemia decorrente do aumento de globulinas (HARTMANN 2011). Todos os animais do presente estudo apresentaram aumento na concentração sérica de proteínas totais. Se for avaliada a proporção de albumina/globulina, de acordo com a literatura, podemos ter seis gatos com diagnóstico laboratorial sugestivo de PIF se a razão considerada for inferior a 0,8 (HARTMANN 2011), ou quatro gatos se essa razão for inferior a 0,5 (DAIHA, 2003). Contudo, à imuno-histoquímica, exceto por um gato, nenhum outro apresentou positividade para o FCoV. A técnica permite a detecção do complexo antígeno-anticorpo, através da visualização do Coronavírus felino associado à lesão (DA MATTA, 2018), permitindo maior precisão diagnóstica para o caso da PIF. Então, é possível inferir que a hiperglobulinemia observada estará relacionada à microflora da cavidade oral de gatos GCF.

No presente estudo, todos os gatos viviam em um ambiente com superlotação de animais e com acesso à rua, ou seja, diariamente são expostos à pressão pelo controle de território e alimento. Tendo em vista que a resposta inflamatória em gatos com GCF pode ter potencialmente origem multifatorial em natureza e possivelmente várias causas incitatórias (WINER et al., 2016), e que fatores comportamentais, ambientais e o estilo de vida são fontes de investigação à anamnese (LYON 2005), era esperado que o estresse

ao qual esses animais são submetidos, poderia interferir de certo modo na expressão gênica do FoxP3. Em ratos, foi demonstrado que o estresse crônico modularia as funções das células imunes através de um aumento significativo da diferenciação de células Tregs (ZHANG et al., 2018).

Não foi observada correspondência entre a avaliação do aspecto clínico da lesão e o grau à análise histopatológica em cinco das amostras dos gatos com GCF. Harley, Gruffydd-Jones, e Day (2011) encontrou uma boa correspondência, na maioria dos casos o histopatológico revelava uma inflamação maior do que o grau de inflamação clinicamente atribuído. O histopatológico é fundamental para a diferenciação da GCF das outras doenças listadas que podem ser facilmente confundidas em gatos com lesões em cavidade oral. No entanto, também tem suas limitações. Possivelmente, o fragmento de mucosa oral colhido não tenha sido suficientemente representativo.

Geralmente, a área de escolha para biópsia excisional em gatos com GCF é a região glossopalatina. Alguns autores justificam a escolha dessa área porque seria o sinal patognomônico da doença. Mais especificamente, é o que difere a GCF de uma simples gengivite, quando a inflamação ultrapassa os limites da junção mucogengival e se estende para a mucosa oral caudal. Adicionalmente, porque as alterações inflamatórias nessa área são consideradas menos propensas a sofrer viés por doenças orodentais concomitantes, como doença periodontal e lesões reabsortivas odontoclásticas nos felinos (HARLEY; GRUFFYDD-JONES; DAY, 2011; LOMMER, 2013; WINER et al., 2016). Mas para o presente estudo optou-se em colher de uma área que fosse acometida comum a todos os scores estabelecidos por Tenorio et al. (1991). Assim, inicialmente, não foi limitado a gatos apenas com a apresentação clínica da doença com acometimento das fauces, visto que a GCF possui caráter crônico. Até mesmo porque a GCF pode ter a presença de doença periodontal severa associada, e até mesmo lesões reabsortivas (LYON 2005).

Uma limitação do estudo é o número de animais. Futuros estudos com um maior número de gatos, compondo um grupo mais homogêneo de gatos totalmente livres de viroses, e/ou que sejam incrementados com outros fatores moduladores da resposta imune, são necessários a fim de se elucidar melhor a expressão do PD-1/PD-L1 e do FoxP3 em gatos com GCF.

6 CONCLUSÃO

Gatos com gengivoestomatite crônica apresentam regulação e inibição da atividade linfocitária no microambiente tecidual principalmente através da expressão gênica do PD-L1. A presença da microflora como fonte de estimulação antigênica parece ser o elemento de perpetuação da expressão gênica de PD-L1 na cavidade oral de gatos com GCF. Não foi encontrada associação da doença e animais portadores de infecções virais, o que reforça o conceito sobre a complexidade da enfermidade e sua origem multifatorial.

REFERÊNCIAS

ACHLEITNER, A.; CLARK; M.E.; BIENZLE, D. Veterinary Immunology and Immunopathology T-regulatory cells infected with feline immunodeficiency virus up-regulate programmed death-1 (PD-1). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, p.307-313, 2011.

BELLEI, E.; DALLA, F.; MASETTI, L.; PISONI, L.; JOECHLER, M. Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). **Veterinary Research Communications**, v.32, p.231–234, 2008.

BOUSSIOTIS, V.A.; CHATTERJEE, P.; LI, L. Biochemical Signaling of PD-1 on T Cells and Its Functional Implications. **Cancer Journal**, v.20, n.4, p.265–271, 2014.

BROWN, J.A.; DORFMAN, D.M.; MA, FENG-RONG; SULLIVAN, E.L.; MUNOZ, O.; WOOD, C.R.; GREENFIELD, E.A.; FREEMAN G.J. blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v.170, p.1257-1266, 2003.

CRAWFORD, C. Progressos no diagnóstico de infecções retrovirais. In: AUGUST, J.R. Medicina Interna de Felinos [tradução Renata Scavone de Oliveira et al.]. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.53-62.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JR., D.; ARAUJO, J.A.P.; SALMAZI, K.C.; KALLAS, E.G.; ANDRADE, L.E.C. Células T Regulatórias Naturais (T_{REGS}) em Doenças Reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.6, p. 342-355, 2008.

DA MATTA, E.C. diagnóstico e caracterização anatomopatológica da peritonite infecciosa felina em gatos. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Ambiental) - Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, 2018.

DAIHA, M.C. Peritonite Infeciosa Felina. In: SOUZA, H.J.M. Coletâneas em medicina e cirurgia felina. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2003. p.363-373.

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

DOLIESLAGER, S.M.J.; RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; LAPPIN, D.F.; JOHNSTON, N.; TAYLOR, D.; BENNETT, D. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. **Veterinary Microbiology**, v.148, n.1, p.93-98, 2011.

DOLIESLAGER, S.M.J.; FRANCIS, D.; BENNETT, D.; GRAHAM, L.; JOHNSTON, N.; PASQUALE, M. The influence of oral bacteria on tissue levels of Toll-like receptor and cytokine mRNAs in feline chronic gingivostomatitis and oral health. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.151, p.263–274, 2013.

DOWERS, K.L.; HAWLEY, J.R.; BREWER, M.M.; MORRIS, A.K.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Association of *Bartonella* species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p.314-321, 2010.

FIFE, B.T.; BLUESTONE, J.A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunological Reviews**, p.224, p.166–182, 2008.

FOLKL, A.; WEN, X.; KUCZYNSKI, E.; CLARK, M.E.; BIENZLE, D. Veterinary Immunology and Immunopathology Feline programmed death and its ligand : Characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.134, p.107–114, 2010.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.4, p.330–336, 2003.

FREEMAN, G.J.; LONG, A.J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L.J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M.C.; HORTON, H.F.; FOUSSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M.R.; CARRENO, B.M.; COLLINS, M.; WOOD, C.R.; HONJO, T. Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.7, p.1027–1034, 2000.

GERMANIDIS, G.; ARGENTOU, N.; HYTIROGLOU, P.; VASSILIADIS, T. Liver FOXP3 and PD1 / PDL1 expression is down-regulated in chronic HBV hepatitis on maintained remission related to the degree of inflammation, **Frontiers in immunology**, v.4, p.1–9, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00207>, 2013.

GIL, S.; LEAL, R.O.; DUARTE, A.; MCGAHIE, D.; SEPÚLVEDA, N.; SIBORRO, I.; et al. Relevance of feline interferon omega for clinical improvement and reduction of concurrent viral excretion in retrovirus infected cats from a rescue shelter. **Research in Veterinary Science**, v.94, p.753–763, 2013.

GRIMM, K.A.; LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W.J.; GREENE, S. A.; ROBERTSON, S. A. In: Lumb & Jones's Veterinary Anesthesia and Analgesia. 5^a Ed. Philadelphia: Blackwell, 2015.

HARLEY, R.; HELPS, C.R.; HARBOUR, D.A.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J. Cytokine mRNA Expression in lesions in cats with chronic gingivostomatitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.4, p.471–478, 1999.

HARLEY, R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J. Immunohistochemical characterization of oral mucosal lesions in cats with chronic gingivostomatitis. **Journal of Comparative Pathology**, v.144, n.4, p.239–250, 2011.

HARTMANN, K. Diagnóstico e tratamento da peritonite infecciosa felina. In: AUGUST, J.R. Medicina Interna de Felinos [tradução Renata Scavone de Oliveira et al.]. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.63-77.

HARUN, M.S.R.; KUAN, C.O.; SELVARAJAH, G.T.; WEI, T.S.; ARSHAD, S.S.; BEJO, M.H.; OMAR, A.R. Transcriptional profiling of feline infectious peritonitis virus infection in CRFK cells and in PBMCs from FIP diagnosed cats. **Virology Journal**, v.10, n.329 p.1-9, 2013.

IWAI, Y.; TERAWAKI, S.; IKEGAWA, M.; OKAZAKI, T.; HONJO T. PD-1 Inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. **The Journal of Experimental Medicine**, v.198, n.1, p.39–50, 2003.

LANKFORD, S.; PETTY, C.; LAVOY, A.; RECKLING, S.; TOMPKINS, W.; DEAN, G.A.; CAROLINA, N. Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.122, p.159–166, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, 402-408, 2001.

LOCKETT, N.N.; SCOTT, V.L.; BOUDREAUX, C.E.; CLAY, B.T.; PRUETT, S.B.; RYAN, P.L.; COATS, K.S. Expression of regulatory T cell (Treg) activation markers in endometrial tissues from early and late pregnancy in the feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cat. **Placenta**, v.31, p.796-802, 2010.

LOMMER, M.J. Oral Inflammation in Small Animals Oral inflammation Small mammals Oral cavity. **Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice**, v.43, n.3, p.555–571, 2013.

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

MARELLI-BERG, F.M.; SCOTT, D.; EMMA, BARTOK, I.; PEEK, E.; DYSON, J.; LECHLER, R.I. Activated murine endothelial cells have reduced immunogenicity for CD8+ T cells: a mechanism of immunoregulation? **The Journal of Immunology**, v.165, p.4182-4189, 2000.

MATILDE, K.S.; LOURENÇO, M.L.G.; ZAHN, F.S.; MACHADO, L.H.A. Complexo gengivite estomatite felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.2, p.160-170, 2013.

MAZANET, M.M.; HUGHES, C.C.W. B7-H1 Is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. **The Journal of Immunology**, v.169, p.3581-3588, 2002.

MILLER, M.M.; AKARONU, N.; THOMPSON, E.M.; HOOD, S.F.; FOGLE, J.E. Modulating DNA methylation in activated CD8+ T cells inhibits Treg cell-induced binding of FoxP3 to the CD8+ T cell IL2. **Journal of Immunology**, v.194, n.3, p.990–998, 2015.

NIZA, M.M.R.E.; MESTRINHO, L.A.; VILELA, C.L. Gengivo-estomatite crônica felina – um desafio clínico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.551, p.127-135, 2004.

PENNING, L.C.; VRIELING, H.E.; BRINKHOF, B.; RIEMERS, F.M.; ROTHUIZEN, J.; RUTTEMAN, G.R.; HAZEWINDEL, H.A.W. A validation of 10 feline reference genes for gene expression measurements in snap-frozen

tissues. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.120, p.212–222, 2007.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN, L.; PARDOLL, D.M.; ALLISON, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **PNAS**, v.104, n.45, p.17765–17770, 2007. Doi: 10.1073/pnas.07087671042007.

POBER, J.S.; MEROLA, J.; LIU, R.; MANES, T.D. Antigen Presentation by vascular Cells. *Frontiers in Immunology*, v.8, artigo 1907, 7 páginas, 2017. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01907.

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

SHARPE, A.H.; WHERRY, E.J.; AHMED, R.; FREEMAN, G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature Immunology**, v.8, p.239–245, 2007.

TERAWAKI, S.; CHIKUMA, S.; SHIBAYAMA, S.; HAYASHI, T.; YOSHIDA, T.; OKAZAKI, T.; HONJO, T. IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of t cell-mediated immunity. **The Journal of Immunology**, v.186, p.2772-2779, 2011.

TENORIO, A.P.; FRANTI, C.E.; MADEWELL, B.R.; NIELS, C. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calicivirus, immunodeficiency, or leukemia viruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.29, p.1-14, 1991.

THOMAS, S.; LAPPIN, D.F.; SPEARS, J.; BENNETT, D.; NILE, C.; RIGGIO, M.P. Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. **Research in Veterinary Science**, v.111, p.124–126, 2017.

WINER, J.N.; ARZI, B.; VERSTRAETE, F.J.M. Therapeutic Management of Feline Chronic Gingivostomatitis : A Systematic Review of the Literature. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, artigo 64, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00054>>.

YAMAZAKI, T.; AKIBA, H.; IWAI, H.; MATSUDA, H.; AOKI, M.; TANNO, Y.; SHIN, T.; TSUCHIYA, H.; PARDOLL, D.M.; OKUMURA, K.; AZUMA, M.; YAGITA, H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. **The Journal of Immunology**, v.169, p.5538-5545, 2002.

ZHANG, H.; CAUDLE, Y.; WHEELER, C.; ZHOU, Y.; STUART, C.; YAO, B.; YIN, D. TGF- β 1/Smad2/3/Foxp3 signaling is required for chronic stress-induced immune suppression. **Journal of Neuroimmunology**, n.314, p.30–41, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A

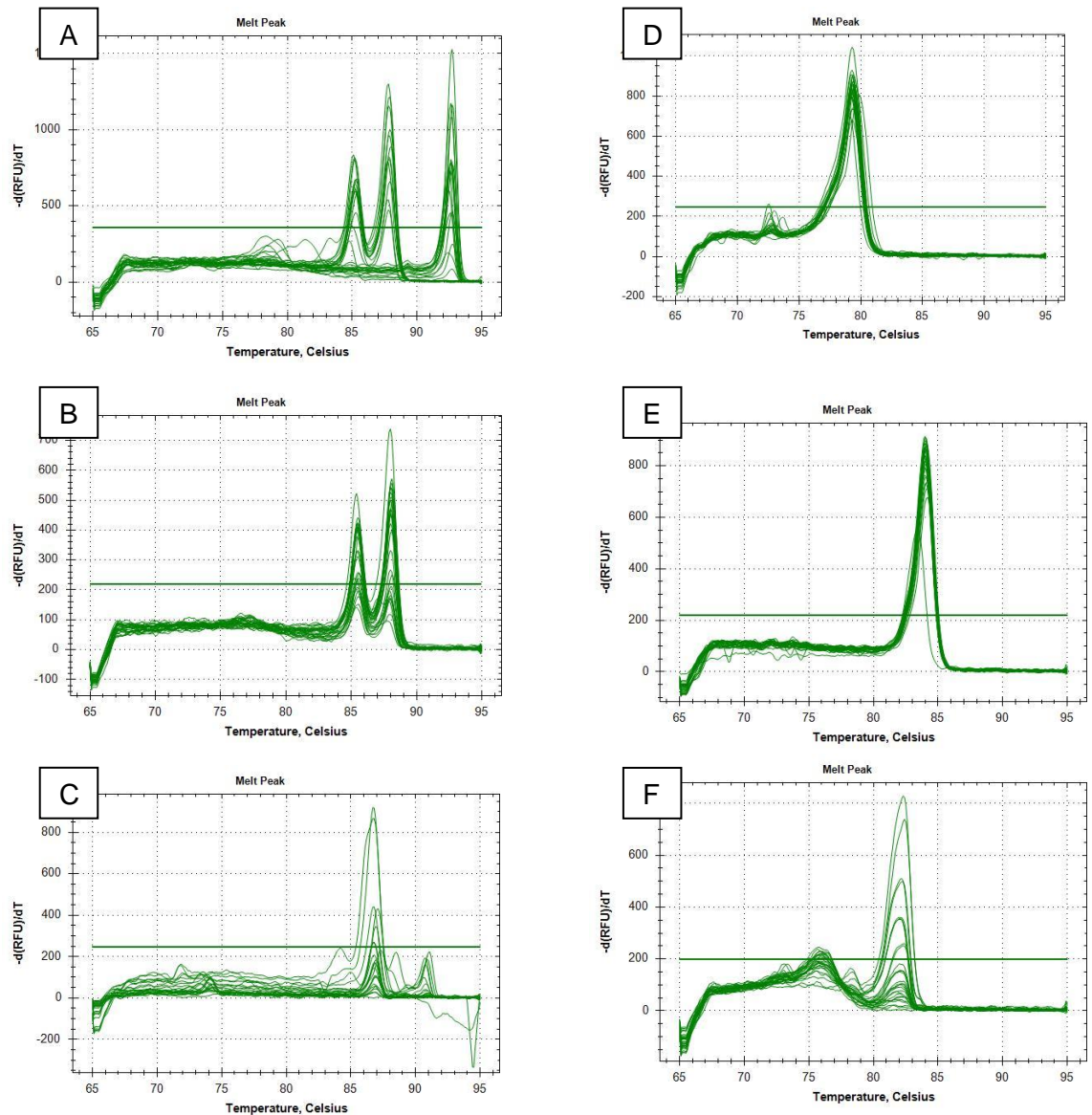


Figura 9 – Gráficos das curvas de *melting* do genes PD-1(A), PD-L1(B), FoxP3(C), YWHAZ(D), RPL17(E) e HPRT(F), em gatos com gengivoestomatite crônica e em gatos saudáveis.

APÊNDICE B

Tabela 4 - Cts da expressão dos genes testados em duplicata (Ct1 e Ct2) Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct E e $2^{\wedge}\Delta\Delta$ Ct.

PD-1

| Sample | Ct1 | Ct2 | Média | Δ Ct | $\Delta\Delta$ Ct | $2^{\wedge}\Delta\Delta$ Ct | Média $2^{\wedge}\Delta\Delta$ Ct |
|------------|-------|-------|-------|-------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Controle 1 | 33,35 | 31,08 | 32,22 | 8,86 | 2,29 | 0,2 | 1,7 |
| Controle 2 | 25,68 | 31,92 | 28,80 | 4,99 | -1,58 | 3,0 | |
| Controle 3 | 29,34 | 28,2 | 28,77 | 4,44 | -2,13 | 4,4 | |
| Controle 4 | 29,55 | 32,28 | 30,92 | 6,31 | -0,26 | 1,2 | |
| Controle 5 | 29,62 | 31,13 | 30,38 | 5,61 | -0,96 | 1,9 | |
| Controle 6 | 31,28 | 32,45 | 31,87 | 8,78 | 2,21 | 0,2 | |
| Controle 7 | 31,82 | 28,68 | 30,25 | 7,00 | 0,43 | 0,7 | |
| Doente 1 | 27,29 | 29 | 28,15 | 5,93 | -0,64 | 1,6 | 2,5 |
| Doente 2 | 29,01 | 29,31 | 29,16 | 7,22 | 0,65 | 0,6 | |
| Doente 3 | 29,22 | 27,04 | 28,13 | 5,20 | -1,37 | 2,6 | |
| Doente 4 | 32,84 | 34,38 | 33,61 | 10,36 | 3,79 | 0,1 | |
| Doente 5 | 30,47 | 30,85 | 30,66 | 4,06 | -2,51 | 5,7 | |
| Doente 6 | 30,25 | 29,38 | 29,82 | 4,50 | -2,07 | 4,2 | |
| Doente 7 | 28,1 | 29,75 | 28,93 | 5,19 | -1,38 | 2,6 | |

PD-L1

| Sample | Ct1 | Ct2 | Média | Δ Ct | $\Delta\Delta$ Ct | $2^{\wedge}\Delta\Delta$ Ct | Média $2^{\wedge}\Delta\Delta$ Ct |
|------------|-------|-------|-------|-------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Controle 1 | 33,08 | 33,06 | 33,07 | 9,72 | 0,13 | 0,9 | 1,4 |
| Controle 2 | 31,21 | 31,07 | 31,14 | 7,33 | -2,26 | 4,8 | |
| Controle 3 | 34,12 | 34,41 | 34,27 | 9,93 | 0,34 | 0,8 | |
| Controle 4 | 35,77 | 33,63 | 34,70 | 10,10 | 0,50 | 0,7 | |
| Controle 5 | 34,39 | 34,55 | 34,47 | 9,71 | 0,11 | 0,9 | |
| Controle 6 | 32,68 | 32,98 | 32,83 | 9,75 | 0,16 | 0,9 | |
| Controle 7 | 34,21 | 33,51 | 33,86 | 10,61 | 1,02 | 0,5 | |
| Doente 1 | 25,74 | 25,5 | 25,62 | 3,41 | -6,18 | 72,7 | 23,6 |
| Doente 2 | 28,02 | 27,5 | 27,76 | 5,82 | -3,77 | 13,6 | |
| Doente 3 | 28,07 | 28,17 | 28,12 | 5,19 | -4,40 | 21,1 | |
| Doente 4 | 29,36 | 29,37 | 29,37 | 6,12 | -3,47 | 11,1 | |
| Doente 5 | 32,63 | 32,33 | 32,48 | 5,88 | -3,71 | 13,1 | |
| Doente 6 | 30,06 | 30,11 | 30,09 | 4,77 | -4,82 | 28,3 | |
| Doente 7 | 31,08 | 30,84 | 30,96 | 7,23 | -2,36 | 5,1 | |

Tabela 4 - Cts da expressão dos genes testados em duplicata (Ct1 e Ct2) ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

(Continua)

| FoxP3 | | | | | | | |
|---------------|------------|------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Sample | Ct1 | Ct2 | Média | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | Média $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
| Controle 1 | 37,6 | 40,86 | 39,23 | 15,88 | 4,31 | 0,1 | 1,8 |
| Controle 2 | 32,88 | 33,87 | 33,38 | 9,57 | -2,00 | 4,0 | |
| Controle 3 | 33,6 | 34,43 | 34,02 | 9,68 | -1,88 | 3,7 | |
| Controle 4 | 38,24 | 35,4 | 36,82 | 12,22 | 0,65 | 0,6 | |
| Controle 5 | 35,27 | 35,18 | 35,23 | 10,46 | -1,11 | 2,2 | |
| Controle 6 | 35,17 | 34,19 | 34,68 | 11,60 | 0,03 | 1,0 | |
| Controle 7 | 35,23 | 34,41 | 34,82 | 11,57 | 0,00 | 1,0 | |
| Doente 1 | 31,77 | 32,19 | 31,98 | 9,77 | -1,80 | 3,5 | 2,3 |
| Doente 2 | 32,67 | 32,05 | 32,36 | 10,42 | -1,14 | 2,2 | |
| Doente 3 | 33,04 | 33,18 | 33,11 | 10,18 | -1,39 | 2,6 | |
| Doente 4 | 36,18 | 34,55 | 35,37 | 12,12 | 0,55 | 0,7 | |
| Doente 5 | 36,83 | 36,4 | 36,62 | 10,02 | -1,55 | 2,9 | |
| Doente 6 | 34,82 | 36,28 | 35,55 | 10,23 | -1,33 | 2,5 | |
| Doente 7 | 34,38 | 34,56 | 34,47 | 10,74 | -0,83 | 1,8 | |

APÊNDICE C

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ dos grupos controle e doentes para gatos com gengivoestomatite crônica de acordo com os genes PD-1, PD-L1 e FoxP3.

| Gene | Grupo | $2^{\Delta\Delta Ct}$ | | P |
|-------|----------|-----------------------|---------------|----------------------|
| | | Média | Desvio Padrão | |
| PD-1 | Controle | 1,67 | 1,5560 | 0,4638 ^a |
| | Doente | 2,48 | 1,9719 | |
| PD-L1 | Controle | 1,36 | 1,5201 | 0,0017* ^b |
| | Doente | 23,59 | 22,9153 | |
| FoxP3 | Controle | 1,79 | 1,5423 | 0,6942 ^a |
| | Doente | 2,32 | 0,8977 | |

a- Teste T; b- Teste de Mann Whitney

APÊNDICE D

Tabela 6 - Número de animais positivos e negativos para gengivoestomatite crônica felina de acordo com a doença viral.

| Doença | Categoria | Gatos doentes | | P* |
|---------------------|-----------|---------------|----------|----|
| | | Positivo | Negativo | |
| PIF | Positivo | 5 | 0 | 1 |
| | Negativo | 2 | 0 | |
| FIV/FelLV/FCV/FHV-1 | Positivo | 1 | 0 | 1 |
| | Negativo | 6 | 0 | |

*Teste exato de Fisher

ANEXO A – CÔMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Expressão gênica de moduladores da resposta imune (PD-1 e FoxP3), de fatores inflamatórios e de fatores associados ao reparo dos tecidos na Gengivostomatite crônica felina", Processo FOA nº 00141-2018, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Maio de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 18 de Janeiro de 2020.

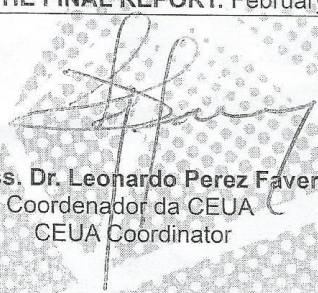
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 18 de Fevereiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Gene expression of immune response modulators (PD-1 and FoxP3), inflammatory and repair factors in feline chronic gingivostomatitis", Protocol FOA nº 00141-2018, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 18, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 18, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – MODELO FICHA

ANIMAL Nº ____ **Nome:** _____ **Sexo:** ____

Idade: _____ **Raça:** _____

Castrado: sim (___) não(___)

Dieta: Ração (___) Caseira (___) Os dois (___)

Vacinação: Tríplice (___) Quádrupla (___) Quíntupla (___)
 Não vacinado (___) Primovacinado (___) Inconpleta (___)

Ambiente: Sozinho (___) Mais 1 gato (___) Multigatos (___)

Acesso à rua: Não (___) Não, mas outros gatos acessam a casa (___) Sim(___)

Tratamento prévio: Prednisolona (___) Depomedrol® (___) Estomorgyl® (___)
 Metronidazol (___) Extração dentária (___) Outro (___)

Análise clínica: Pontuações 0 (___) 1 (___) 2 (___) 3 (___)

0 = aparência normal;
 1= vermelhidão/linha na gengiva, sem ulceração;
 2= vermelhidão mais grave da gengiva com proliferação de tecidos e exsudação;
 3= doença gengival/periodontal e ulceroproliferativa com lesões no palato, fauces, bochechas e/ou língua.

Resultado teste rápido: FIV (___) FeLV (___) PIF (___)

Resultado PCR: Herpesvirus (___) Calicivirus (___)

Bioquímico: Uréia _____ mg/dl (42,63 - 64,01) Creatinina _____mg/dl (0,80 - 1,80)

Eventos recentes: Vacinação (___) Mudança de casa (___) Chegada recém-nascido (___)
 Viagem (___) Falecimento de ente querido (___) Gatos vizinhos (___)
 Obra na casa (___) Outro: _____