



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O PAPEL DA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA NA MONITORIZAÇÃO
CLÍNICA DA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO: UM ESTUDO
EXPLORATÓRIO

RITA MOURÃO ROSA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Alves Carreira
Doutor Rodolfo Assis Oliveira Leal
Doutora Lisa Alexandra Pereira
Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira
Mestrinho

CO-ORIENTADOR

Dr. Rui Jorge Geada Ferreira Onça

2018

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O PAPEL DA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA NA MONITORIZAÇÃO
CLÍNICA DA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO: UM ESTUDO
EXPLORATÓRIO

RITA MOURÃO ROSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

Doutor Rodolfo Assis Oliveira Leal

Doutora Lisa Alexandra Pereira

Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira

Mestrinho

CO-ORIENTADOR

Dr. Rui Jorge Geada Ferreira Onça

2018

LISBOA

A todas as pessoas que me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado, ao meu porto de abrigo, agradeço todo o empenho, ajuda e apoio incondicional. Obrigada por tudo!

À minha orientadora, Professora Lisa Mestrinho, que sempre me apoiou e incentivou na procura de novos conhecimentos. Com ela, descobri a odontologia e fascinei-me pela cirurgia de cabeça e pescoço. Espero poder continuar a aplicar tudo o que aprendi e continuar sempre a desafiar-me, como me ensinou. O meu muito obrigada, foi uma honra ter sido sua estagiária.

Ao meu co-orientador, Dr. Rui Onça, que me orienta desde o meu terceiro ano de aluna e que me ajudou a perceber que é no bloco operatório que me sinto em casa. Ainda hoje me transmitem conhecimentos que o Dr. Rui já me tinha ensinado faz muito tempo. Excelente professor e cirurgião. Obrigada por me ter ajudado.

À minha família que muito esforço fez para me ajudar a fazer este mestrado, agradeço por todo o empenho, dedicação e incentivo. Custou eu sei, mas parece que finalmente encontrei o que gosto de fazer.

A toda a equipa da AZP, foram todos fantásticos, ensinaram-me grande parte do que sei hoje. Lutei para que um dia sentisse diferença e embora ainda seja muito “pequenina”, já a sinto. Não me vou esquecer onde cresci e onde dei os meus primeiros passos.

A toda a equipa do HEV, obrigada por todos os ensinamentos. Um obrigado especial aos membros da equipa de cirurgia por me ajudarem, incentivarem e animarem nos momentos mais complicados do estudo e sobretudo pela amizade que surgiu durante este estágio.

O meu agradecimento a toda a equipa da ANIAID, por moverem mundos e fundos para me ajudarem a encontrar gatos para o estudo. Obrigada Dra. Margarida Serrano por me incentivar a alargar os meus conhecimentos na medicina interna.

O meu sincero agradecimento ao Dr. Ricardo Santos por me ter ajudado. Foi sem dúvida importante nos momentos chave. Agradeço também ao Dr. Vasco Branco que tirou uma tarde inteira do seu trabalho só para me ajudar.

Ao Dr. Hugo Pissarra agradeço a paciência e ajuda prestada. Muito obrigada pelo apoio e compreensão.

Ao Professor Dr. Telmo Nunes agradeço por toda a ajuda e tranquilidade transmitida, aquando da realização da análise estatística.

Agradeço também a todos os médicos veterinários que se cruzaram comigo e não hesitaram em prestar o seu contributo, nomeadamente a Dra. Inês Almeida, Dra. Telma Almeida e equipa da VetAlmada.

Ainda um grande obrigado aos meus colegas de faculdade e de estágio pelo companheirismo durante todo este percurso.

APOIOS FINANCEIROS

O presente trabalho foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, através de uma bolsa para projecto de investigação (Ref. 012/2018).

O PAPEL DA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA NA MONITORIZAÇÃO CLÍNICA DA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO: UM ESTUDO EXPLORATÓRIO

RESUMO

A alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) é uma proteína de fase aguda cuja concentração sérica se encontra elevada nas doenças sistémicas nos gatos.

O objetivo do presente estudo consistiu em determinar os níveis de AGP numa amostra de animais com gengivoestomatite crónica (GECF), comparar os mesmos com um grupo saudável e verificar a sua evolução em dois momentos pós-cirúrgicos (dia 30 e dia 60).

Foram selecionados 20 gatos: 10 controlos e 10 doentes, sem co-morbilidades diagnosticadas. Procedeu-se ao doseamento da AGP sérica com recurso a um *kit* AGP-8 de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Todos os gatos do grupo doentes apresentam lesões clínicas graves de mucosite caudal e estomatite, alterações histológicas de inflamação máxima, bem como positividade para a presença de antigénio para o calicivírus felino reforçando a homogeneidade deste grupo.

Foi observado um aumento significativo da concentração sérica de AGP nos gatos afetados, confirmando que existe inflamação com impacto sistémico. Observou-se ainda uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre os valores de AGP e a presença de mucosite caudal no dia 0, a presença de estomatite nos dias 30 e 60.

Este estudo exploratório sugere que este biomarcador poderá ser útil como fator de mau prognóstico do tratamento cirúrgico.

Palavras-chave: gengivoestomatite crónica felina, alfa-1 glicoproteína ácida, gato, extrações dentárias, biomarcador, calicivírus felino.

THE ROLE OF ALPHA-1 ACID GLYCOPROTEIN IN CLINICAL MONITORING OF CHRONIC GINGIVOSTOMATITIS IN CAT: AN EXPLORATORY STUDY

ABSTRACT

Alpha-1 acid glycoprotein (AGP) is an acute phase protein found to be high in systemic diseased cat's.

The objective of the present study was to determine AGP seric levels in a sample of animals with chronic gingivostomatitis (FCGS), compare those with a healthy group and evaluate their levels in 2 post-operative moments (30 and 60 days).

Twenty cats were selected: 10 controls and 10 diseased, without diagnosed co-morbidities. Serum AGP was determined using an AGP-8 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

In this study all diseased cats presented severe clinical lesions of caudal mucositis and bucostomatitis, histological findings of maximal inflammation, and positive isolation feline calicivirus (FCV) antigen, reinforcing the homogeneity of the group.

The serum concentration of AGP is significantly increased in the FCGS group, confirming that these cats are in a systemic inflammatory state. A positive statistically significant association was found between AGP values and the presence of caudal mucositis and stomatitis lesions, in the pre-operative and post operative moment.

This exploratory study suggests that this biomarker may be useful as poor prognostic fator of surgical treatment.

Key words: Feline chronic gingivostomatitis, alpha-1 acid glycoprotein, cat, dental extractions, biomarker, feline calicivirus.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
1. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR	1
a. Casuística da área de cirurgia geral	2
b. Casuística da área de cirurgia de exóticos	2
c. Casuística da área de cirurgia ortopédica e neurocirúrgica	3
d. Casuística da área de odontologia	3
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
a. Mucosa oral e Periodonto	5
2. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS ORAIS NO GATO	8
a. Gengivite hiperplásica juvenil	8
b. Reabsorções dentárias	9
c. Doença periodontal	10
d. Complexo Granuloma Eosinofílico	11
e. Gengivoestomatite Crónica em Gatos	12
i. Etiopatogenia	12
ii. Prevalência	13
iii. Sinais clínicos	14
iv. Diagnóstico	15
v. Tratamento	16
3. SÍNDROME ASSOCIADA A DOENÇAS ORAIS	19
a. Síndrome de dor orofacial felina	19
4. RESPOSTA AGUDA À INFLAMAÇÃO	21
a. Proteínas de fase aguda	21
i. Proteínas de fase aguda positiva	22
ii. Proteínas de fase aguda negativa	23
b. Uso das Proteínas de fase aguda na monitorização de doenças	23

5.	ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA.....	25
a.	A estrutura da AGP	27
b.	A síntese da AGP	27
c.	Mediadores da inflamação indutores da síntese de AGP	28
d.	Funções da AGP	30
e.	Doseamento da AGP	31
PARTE III - VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO NA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA		33
1.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
a.	Introdução.....	33
b.	Objetivos.....	33
c.	Amostra	33
d.	Critérios de seleção.....	34
e.	Critérios de exclusão	34
f.	Procedimentos	34
i.	Questionário aos tutores	34
ii.	Procedimento anestésico	35
iii.	Exame estomatológico-dentário	35
iv.	Radiografias dentárias	35
v.	Outros exames complementares de diagnóstico.....	36
vi.	Tratamento Dentário.....	37
g.	Recolha de amostras sanguíneas para doseamento de AGP.....	37
h.	Classificação de resposta ao tratamento	37
i.	Doseamento da alfa-1 glicoproteína ácida.....	38
j.	Análise estatística	39
2.	RESULTADOS	39
a.	Caracterização da amostra	39
b.	Sinais clínicos	40
c.	Radiografias dentárias intra-orais.....	41
d.	PCR de calicivírus	41
e.	Histopatologia.....	41
f.	Resposta ao tratamento.....	42
g.	Resultados do doseamento da AGP.....	44
h.	Comparação de grupos	48
3.	DISCUSSÃO	50
a.	Qual o benefício do doseamento da AGP na GECEF?.....	55

b.	Limitações do estudo	56
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
	ANEXOS	I
	Anexo I	I
	Anexo II	II
	Anexo III	III
	Anexo IV	IV
	Anexo V	V
	Anexo VI	VI
	Anexo VII	VII
	Anexo VIII.....	VIII
	Anexo IX	X

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático da gengiva. Segundo Pawlina & Ross (2016).	6
Figura 2 – Superfícies das mucosas da cavidade oral. (Original).....	7
Figura 3 – Imagens ilustrativas de gengivite juvenil (à esquerda) e hiperplasia gingival secundária à administração de ciclosporina. (Original).....	8
Figura 4 – Imagem ilustrativa de inflamação e proliferação localizada da gengiva nas zonas afetadas. (Original).	9
Figura 5 – Radiografia ilustrativa de lesões de RD no gato.	10
Figura 6 – Imagem ilustrativa de DP num gato. Presença de abundante cálculo dentário.	11
Figura 7 – Fotografia ilustrativa de uma úlcera eosinofílica num gato com 1 ano de idade. Fotografia gentilmente cedida por Lisa Mestrinho.....	11
Figura 8 – Gato, macho, 9 anos de idade, com gengivoestomatite crónica. As fotografias ilustram os sinais clínicos como ptialismo e pêlo em mau estado (à esquerda), assim como diferentes tipos de lesões observadas: mucosite caudal e ulceração lingual (no meio), e estomatite marcada junto ao dente 104 (à direita).....	14
Figura 9 – Gato, macho, 2 anos de idade com gengivoestomatite crónica. A fotografia ilustra a exuberante estomatite e mucosite caudal, envolvendo os arcos palatoglossos.....	15
Figura 10 – Fotografia ilustrativa do posicionamento radiográfico (à esquerda) e radiografia da projecção inferior dos incisivos mandibulares (à direita). Fotografia gentilmente cedida por Lisa Mestrinho.	16
Figura 11 – Radiografias ilustrativas após extrações dentárias.	17
Figura 12 – Mecanismos da produção de PFA pelos hepatócitos. Segundo Cerón et al. (2005).	22
Figura 13 – Fotomicrografias (ampliação 100x) da mucosa oral, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) (barra 20µm), de gatos com GEFCF (grupo doentes), grau 3 segundo a escala de Harley et al., 2011. À esquerda ilustra a presença regular e intensa de células de Mott (M). À direita, a lâmina própria/submucosa contém um denso infiltrado inflamatório com proporções variáveis de linfócitos (L), plasmócitos (P) e neutrófilos (N)...	41
Figura 14 – Fotomicrografias da mucosa oral, coradas com H&E, de gatos com GEFCF (grupo doentes), grau 3 segundo a escala de Harley et al., 2011. À esquerda (ampliação de 10x) (barra 200µm), ilustra extensa área com ulceração (U) existindo apenas uma zona com epitélio normal (E). Presença de exsudação superficial com células inflamatórias e hemorragia (H). Ao centro (ampliação 20x) (barra 100µm), observam-se regiões com degeneração epitelial (D), espongirose (S) e edema (ED). À direita (ampliação 20x) (barra 100µm), realça-se a substituição de algumas zonas da lâmina própria por tecido de granulação (G), sendo notório o elevado número de neovasos (V).	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia geral, realizadas durante o estágio.....	2
Tabela 2 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia de animais exóticos, realizadas durante o estágio.	3
Tabela 3 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia ortopédica e neurocirúrgica, realizadas durante o estágio.	3
Tabela 4 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de odontologia, realizadas durante o estágio.	4
Tabela 5 – Principais PFA relacionadas com o diagnóstico de doenças em gatos. Segundo Gómez-Laguna et al. (2011).	26
Tabela 6 – Doseamento da AGP em gatos saudáveis não livres de patógenos específicos.	32
Tabela 7 – Sistema de classificação para as alterações histopatológicas. Segundo Harley et al. (2011).	36
Tabela 8 – Valores exemplo, cedidos pelo fornecedor do kit, para construção de uma curva padrão.	38
Tabela 9 – Valores fornecidos nas instruções do kit ELISA, obtidos em cinco gatos saudáveis.....	39
Tabela 10 - Descrição dos grupos controlo e estudo (SRD – sem raça definida; M – macho; F – fêmea).	40
Tabela 11 - Média dos 4 quadrantes das áreas totais de lesões, dos graus de estomatite e de mucosite caudal aos 0, 30 e 60 dias.	43
Tabela 12 – Classificação de resposta ao tratamento cirúrgico.	44
Tabela 13 - Concentração de AGP obtida nos gatos do grupo controlo.....	44
Tabela 14 – Concentração de AGP obtida nos gatos do grupo com doença (pré e pós-tratamento).....	45
Tabela 15 – Relação da presença de RD com AGP no dia 0.....	45
Tabela 16 – Correlação entre a média da concentração de AGP nos diferentes períodos estudados e a média do grau das lesões encontradas.....	46
Tabela 17 – Relação entre a EDT com a concentração de AGP no primeiro e último tempo estudado.....	47
Tabela 18 – Resultados da análise estatística inferencial dos dois grupos de estudo (grupo controlo e grupo doentes).	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução das médias dos graus: das áreas totais das lesões, da estomatite e mucosite caudal aos 0, 30 e 60 dias.....	43
Gráfico 2 - Relação entre a média do grau de mucosite caudal no dia 0 com a concentração de AGP (mg/mL).....	47
Gráfico 3 – Relação entre o nível de AGP (mg/mL) no dia 60 com o grau de EDT. p=0,055.....	48
Gráfico 4 – Representação dos resultados da concentração da AGP felina nos grupos estudados (grupo controlo e grupo doentes no dia 0).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP - Adenosina-Difosfato
AGP - alfa -1 glicoproteína ácida
ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro
CD – *Cluster of Differentiation*
IC – Intervalo de Confiança
COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
CV – Coeficiente de Variação
CVF - Calicivírus Felino
 σ – Desvio Padrão
DP – Doença Periodontal
EDT – Eficácia do Tratamento
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do Inglês, “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”)
FeLV - Vírus da Leucemia Felina
FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina
FLUTD – Doença do Trato Urinário Inferior Felino (do Inglês, “*Feline Low Urinary Tract Disease*”)
GECF – Gengivoestomatite Crónica Felina
H&E - Hematoxilina e eosina
HEV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
Hp - Haptoglobina
HVF - Herpesvírus Felino
IL – Interleucina
IR – Insuficiência Renal
IT – Imunoturbidimetria
NOS2 - Sintetase de Óxido Nítrico 2 (do Inglês, “*Nitric Oxide Synthase 2*”)
p – Nível de significância
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PFA – Proteínas de fase aguda (do Inglês, “*Acute Phase Protein*”)
PIF - Peritonite Infeciosa Felina
RD – Reabsorções Dentárias
rFeIFN- ω – Interferão omega recombinante felino
RID – Radioimunodifusão
 ρ – Coeficiente de correlação
SAA - Amiloide Sérica A (do Inglês, “*Serum amyloid A*”)
SDOF - Síndrome de Dor Orofacial Felino (do Inglês, “*Feline Orofacial Pain Syndrome*”)
SDR – Sem raça definida
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α (do Inglês, “*Tumor Necrosis Fator*”)
TPLO – Osteotomia de nivelamento do plateau tibial (do Inglês, “*Tibial Plateau Leveling Osteotomy*”)

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

1. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular decorreu de 4 de setembro de 2017 a 8 de março de 2018, tendo sido realizado 80% no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, e os restantes 20% na Clínica Veterinária AniAid (Lisboa), sob orientação da Professora Doutora Lisa Mestrinho.

O estágio focou as seguintes áreas cirúrgicas: geral, de exóticos, ortopédica, neurológica e oral, no qual foi possível aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, para além de adquirir novos conhecimentos e competências práticas.

Ao longo do meu percurso académico realizei vários estágios extra-curriculares, tanto em medicina interna como na área cirúrgica, sendo que, do contacto com as várias especialidades, surgiu especial interesse pela área cirúrgica.

No serviço de cirurgia do HEV, enquanto estagiária, participei em procedimentos cirúrgicos, como ajudante de cirurgião, chegando, por vezes, a realizar pequenos procedimentos sob supervisão, nomeadamente suturas, exérese de pequenos nódulos, orquiectomias e ovariectomias. Na área da odontologia e cirurgia oral aprendi a realizar radiografias dentárias intraorais, procedimentos de destarização e polimento dentário, suturas e algumas extrações de forma autónoma. Fui sempre incentivada a realizar treino dos procedimentos em cadáver, o qual me ajudou no aumento da destreza e confiança na realização dos mesmos. Realizei ainda monitorização anestésica dos animais familiarizando-me com conceitos anestésicos, medicações pré-anestésicas, anestésicas e pós-anestésicas. Assisti a exames complementares de diagnóstico e/ou mesmo interventivos, envolvendo a anestesia geral do animal, tais como: endoscopias digestivas, vídeo-otoscopias, rinoscopias e procedimentos de radiografia intervencionista.

As cirurgias de exigência técnica superior requerem planeamento cirúrgico, pelo que houve aumento de competências também nessa área, com análise detalhada dos exames complementares de diagnóstico, tomografia computadorizada, uretrocistografias retrógradas, imagens radiográficas e ecográficas, realizados pré-cirurgicamente.

Tive a oportunidade de assistir a diversas consultas de odontologia, com a minha orientadora, assim como consultas pré-cirúrgicas para procedimentos agendados.

A apresentação da casuística divide-se em quatro áreas: cirurgia geral, cirurgia de animais exóticos, cirurgia ortopédica e neurocirúrgica, e odontológica.

a. Casuística da área de cirurgia geral

Os procedimentos mais observados na área de cirurgia geral foram as esterilizações, com maior número de procedimentos no sexo masculino.

Na cirurgia ao aparelho gastrointestinal incluíram-se procedimentos como: enterotomias, enterectomias, gastrotomias e gastropexias, correção de torções gástricas, colocação de tubo de esofagostomia, biópsias intra-operatórias, correção de *shunt* porto-cava, correção de prolapso retal e colecistectomia.

Relativamente ao aparelho urinário pude assistir a cistotomias e a uma reconstrução de uretra num animal uretrotomizado.

Na abordagem à cabeça e ao pescoço são de destacar as cirurgias ao ouvido (por exemplo: ablação do conduto auditivo externo, osteotomia ventral da bula timpânica), palatoplastias e correção da estenose das narinas em braquicéfalos, tiroidectomia, maxilectomias e mandibulectomia.

Finalmente, na cavidade torácica assisti a correções de hérnias diafragmáticas, de persistência de ducto arterioso, bem como à colocação de sistemas de drenagem torácica (Pleurocan®).

Tabela 1 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia geral, realizadas durante o estágio.

	<i>Cirurgias</i>	<i>Percentagem</i>
<i>Cirurgia geral</i> (70,46%)	Aparelho reprodutor	34.89%
	Aparelho urinário	1,87%
	Aparelho gastrointestinal	12,88%
	Sistema tegumentar	30.44%
	Sistema sensorial	8.66%
	Aparelho respiratório	1,64%

b. Casuística da área de cirurgia de exóticos

O animal exótico mais frequentemente intervencionado foi o coelho-anão sendo a odontoplastia a cirurgia mais prevalente.

Existiu alguma diversidade de animais exóticos como ratazanas, chinchilas, cão da pradaria, porquinhos da índia, tartarugas e psitacídeos.

Tabela 2 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia de animais exóticos, realizadas durante o estágio.

	<i>Cirurgias</i>	<i>Percentagem</i>
<i>Cirurgia em animais exóticos (3,63%)</i>	Odontoplastias e exodontias	45,45%
	Exérese de neoplasias	31,82%
	Osteossíntese	4,55%
	Outras*	18,18%

*Manejo cirúrgico de feridas, corte de bicos, suturas, remoção de corpos estranhos.

c. Casuística da área de cirurgia ortopédica e neurocirúrgica

A cirurgia ortopédica é a área de diferenciação do meu co-orientador e por isso acompanhei-o em diversas cirurgias, com principal destaque para a ligamentoplastia com a técnica osteotomia de nivelamento do plateau tibial, do inglês *Tibial Plateau Leveling Osteotomy*, TPLO. Quanto à área neurocirúrgica, as cirurgias a que mais assisti foram a hemilaminectomia e a Ventral Slot.

Tabela 3 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de cirurgia ortopédica e neurocirúrgica, realizadas durante o estágio.

	<i>Cirurgias</i>	<i>Percentagem</i>
<i>Cirurgia ortopédica e neurocirúrgica (4,79%)</i>	Osteossínteses	44,82%
	Hemilaminectomia	20,69%
	Ligamentoplastia	17,24%
	Outras*	17,24%

*Amputação de membros ou dígitos, laminectomias, correção de luxação patelar.

d. Casuística da área de odontologia

O tratamento periodontal e a extração dentária foram os procedimentos mais realizados na área de odontologia, com maior intervenção na espécie canina. Todos os animais que são referenciados para o serviço de estomatologia realizam raio-X intraoral para diagnóstico de afeções dentárias. É removido todo o cálculo dentário com a utilização de ultrassons seguindo-se a realização dos procedimentos recomendados para o tratamento das afeções diagnosticadas. Por fim, realiza-se o polimento dentário de todos os dentes.

Realizou-se endodontia em dois animais: um que sofria de má oclusão classe I dos caninos inferiores, o qual foi submetido a odontoplastia e endodontia, e o outro que sofreu uma fratura de mandíbula com avulsão dos dois caninos inferiores, sendo realizada no primeiro tempo cirúrgico a osteossíntese com fêrula interdentária e no segundo tempo, um mês depois, as endodontias dos mesmos.

Tabela 4 - Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas, na área de odontologia, realizadas durante o estágio.

	<i>Cirurgias</i>	<i>Percentagem</i>
<i>Odontologia (21,12%)</i>	Destartarizações e extrações dentárias	91,93%
	Endodontias	4,84%
	Odontoplastia	2,42%
	Ortodontia	0,81%

PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo boca designa não só a cavidade oral e as estruturas que a delimitam, mas também as estruturas acessórias: os dentes, a língua e as glândulas salivares (Dyce, Sack & Wensing, 2010).

A cavidade oral divide-se em vestíbulo oral e cavidade oral propriamente dita. O vestíbulo é o espaço que se delimita caudal e medialmente pelos dentes e gengiva, e, rostral e lateralmente pelos lábios e bochechas (Evans & Lahunta, 2013). Por sua vez, a cavidade oral propriamente dita é delimitada dorsalmente pelo palato duro e palato mole; rostral e lateralmente pela arcada dentária; e ventralmente, pelo pavimento da cavidade oral, por sua vez constituído pela língua e pela mucosa oral ventral (WSAVA, 2017).

a. Mucosa oral e Periodonto

A mucosa oral reveste a superfície da boca sendo composta, na sua camada mais externa, por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e não-queratinizado pigmentado. A submucosa é composta por tecido conjuntivo laxo, fibras musculares, glândulas salivares e seus ductos, vasos sanguíneos e linfáticos. O palato particulariza-se por possuir colagénio denso na sua submucosa (Pawlina & Ross, 2016).

A mucosa oral divide-se em mucosa de revestimento, mastigatória e especializada. Esta classificação baseia-se nas características histológicas dos tecidos.

A gengiva é uma estrutura especializada da mucosa oral localizada à volta do colo dentário, fixando-se firmemente ao dente e ao tecido ósseo alveolar adjacente. A gengiva é composta pelos seguintes epitélios: epitélio oral, formado por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e, nalguns pontos, paraqueratinizado, que cobre a superfície oral da gengiva aderida e das papilas gengivais; epitélio do sulco, formado por epitélio não queratinizado, uma extensão do epitélio oral para o interior do sulco gengival; e, epitélio juncional que se encontra na base do sulco gengival, aderindo-se firmemente ao esmalte dentário da porção mais apical da coroa dentária, através de hemidesmossomas (Pawlina & Ross, 2016; Bellows, 2010). Tanto o epitélio do sulco gengival como o epitélio juncional são epitélios de células pavimentosas não queratinizadas com um rápido tempo de renovação (5 a 8 dias) (Andersson, Gorrel & Verhaert, 2013).

O termo periodonto é usado para descrever todos os tecidos de suporte dos dentes, que incluem a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar (Bellows, 2010). A gengiva marginal, também chamada de gengiva livre, trata-se da gengiva que não se encontra fixada ao dente, estando apenas a cobri-lo (Figura 1). O espaço entre o dente e a gengiva livre designa-se sulco gengival, cuja profundidade normal no cão é de 0-3mm e no gato 0-1mm. (WSAVA, 2017). Existe uma pequena depressão que separa a gengiva livre da gengiva aderida, denominado sulco marginal, que corresponde à profundidade do sulco gengival.

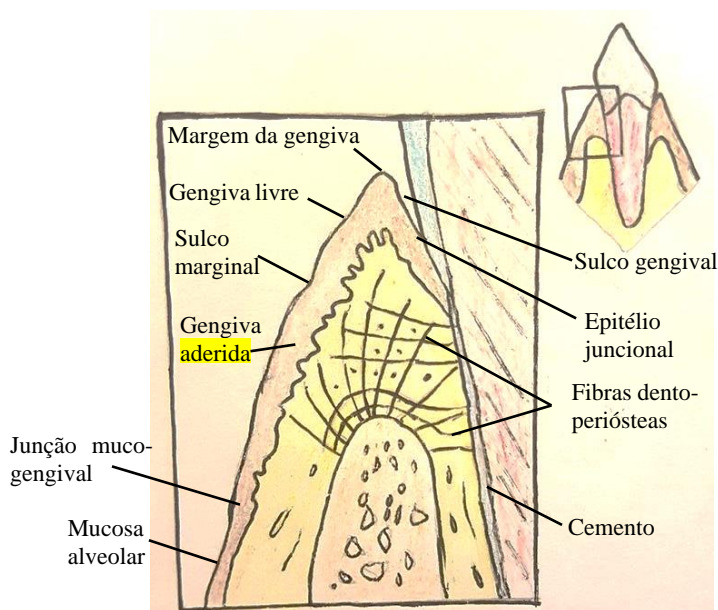


Figura 1 – Diagrama esquemático da gengiva. Segundo Pawlina & Ross (2016).

A gengiva aderida está localizada apicalmente à gengiva livre estando fortemente fixada ao periósteo do osso alveolar. Trata-se de uma estrutura com revestimento de mucosa mastigatória, queratinizada, capaz de suportar o stress da mastigação, sendo a sua espessura variável nas diferentes áreas da boca, atingindo a espessura máxima nos dentes caninos maxilares.

A mucosa alveolar é contígua à gengiva aderida através da junção muco-gengival, junção que se mantém estacionária ao longo da vida (Figura 2) (Bellows, 2010).



Figura 2 – Superfícies das mucosas da cavidade oral. (Original)

O ligamento periodontal propriamente dito, é uma unidade de tecido conjuntivo que atua como um ligamento suspensor do dente, participando na fixação do cemento do dente ao osso alveolar. Este é composto por fibras de colagénio que se dividem três categorias distintas: gengivais, trans-septais e alvéolo-dentárias. As fibras gengivais são encontradas na gengiva livre, num padrão circular à volta do dente, providenciando um suporte adicional para a manter firmemente agarrada ao dente. As fibras trans-septais estendem-se do cemento de um dente, através da área interproximal, ao cemento do dente adjacente. Finalmente, as fibras alveolodentais estendem-se do osso alveolar até ao cemento do dente (Wiggs & Lobprise, 1997). Para além da sua constituição fibrosa, o ligamento periodontal possui várias terminações sensitivas dolorosas, de pressão e sensíveis ao calor e ao frio.

O cemento constitui uma camada de tecido não vascularizada e sem inervação, cuja densidade é superior à do osso alveolar, possuindo uma mineralização de aproximadamente de 45-50% (hidroxiapatite) e 55-50% de tecido conjuntivo. Este cobre a superfície da raiz dentária tendo um papel fundamental no suporte da mesma.

O osso alveolar é composto por quatro camadas, o perióstio, o osso cortical, osso trabecular e pela placa cribiforme, sendo que esta última delimita o sulco alveolar. Os vasos sanguíneos e os nervos presentes no osso alveolar, atravessam esta placa cribiforme para irrigar e inervar o ligamento periodontal (Andersson et al., 2013).

2. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS ORAIS NO GATO

A espécie felina é afetada por um conjunto de doenças inflamatórias da cavidade oral com etiopatogenia ainda pouco conhecida, conduzindo ainda hoje a muitas dificuldades no diagnóstico e tratamento das mesmas. Algumas destas doenças, pelo seu cariz multifatorial dificultam a escolha de uma terapêutica eficaz (Pedersen, 1992).

a. Gengivite hiperplásica juvenil

A gengivite hiperplásica juvenil pode ser diagnosticada em gatos juvenis ou jovens adultos, que se apresentem com hipertrofia e inflamação da gengiva, não havendo extensão à restante mucosa oral (Figura 3) (Reiter & Soltero-Rivera, 2017). Clinicamente a gengiva aderida encontra-se inflamada, chegando mesmo a cobrir a coroa clínica dos dentes pré-molares e molares, dando origem a pseudobolsas. Os gatos afetados são bastante jovens com os sinais clínicos iniciais coincidentes com o final da erupção dentária. Existem, no entanto, alguns medicamentos cujos efeitos secundários incluem hiperplasia gengival dos quais são exemplos os bloqueadores dos canais de cálcio e a ciclosporina (Bellows, 2010a). A sua apresentação pode ser semelhante mantendo-se apenas a gengiva com formação de pseudobolsas e afetando sobretudo animais relativamente jovens. A maioria dos autores concorda que a higiene oral atua positivamente sobre este tipo de lesões, diminuindo o grau de inflamação, hemorragia e dor, embora não controle o crescimento gengival induzido por fármacos (Figura 3) (Ramalho et al., 2003).



Figura 3 – Imagens ilustrativas de gengivite juvenil (à esquerda) e hiperplasia gengival secundária à administração de ciclosporina. (Original)

O tratamento da primeira afeção consiste em esperar pela erupção dos dentes, bem como a limpeza dos dentes a cada três a seis meses, realizando-se destartarização, polimento dentário e gengivectomia da gengiva hiperplásica, poupando pelo menos 2 mm da gengiva aderida. O tratamento com laser pode ser útil para a ablação do tecido hiperplásico, contudo este procedimento deve ser apenas considerado por médicos veterinários com experiência nesta

técnica (Beckman, 2010). Alguns destes animais desenvolvem inflamação orofaríngea crônica enquanto outros apresentam regressão da doença num espaço temporal que pode ir de meses a anos após o tratamento (Bellows, 2010a). Os donos devem depois ser encorajados a realizar escovagem diária com uma pasta dentífrica contendo 8.5% de azitromicina, visto que a utilização deste fármaco mostrou reduzir a ocorrência de hiperplasia gengival em cães (Reiter & Soltero-Rivera, 2017).

b. Reabsorções dentárias

As reabsorções dentárias (RD) resultam da destruição da estrutura dentária pela atividade de células multinucleadas denominadas odontoclastos. Estima-se que um terço da população felina doméstica irá sofrer deste tipo de lesões, uma vez que a idade é um dos principais fatores de risco (Reiter & Mendonza, 2002). Este processo, inicia-se no cemento, progredindo depois para a dentina onde envolve os seus túbulos, afetando quer a dentina da coroa, quer a da raiz dentária (Andersson et al., 2013b). As zonas destruídas são substituídas por tecidos semelhantes ao osso, resultando na perda total do dente por substituição ou perda da coroa, sem substituição do dente (Bellows, 2010).

Estas lesões podem ser extremamente dolorosas, especialmente quando afetam a coroa dentária, expondo o canal pulpar. Neste caso, o animal pode manifestar comportamentos de dor, nomeadamente, movimentos bucais repetitivos, dor na mastigação ou hipersalivação (DentalVets, 2011), ou não apresentar quaisquer sinais clínicos (Bellows, 2010a).

O diagnóstico desta afeção é feito com recurso ao exame radiográfico, onde se visualiza lise dos tecidos dentários. A observação de gengivite localizada com hemorragia espontânea aquando da exploração e rugosidade na superfície do dente são achados que apontam para este diagnóstico (DentalVets, 2011).



Figura 4 – Imagem ilustrativa de inflamação e proliferação localizada da gengiva nas zonas afetadas. (Original).

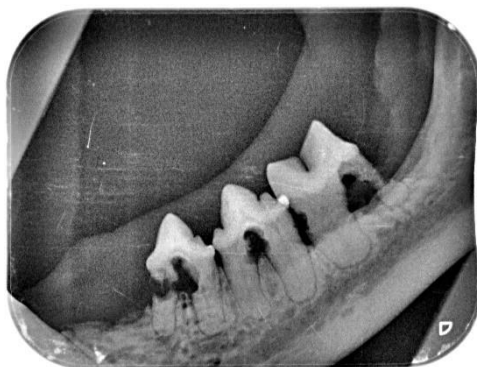


Figura 5 – Radiografia ilustrativa de lesões de RD no gato.

O objetivo de qualquer tratamento é aliviar a dor, impedir a progressão da doença e restaurar a função. Até à presente data, não existe nenhum tratamento conhecido que previna o desenvolvimento e progressão destas lesões, denominadas ainda de idiopáticas. Atualmente o manejo conservativo, as extrações dentárias, ou a amputação das coroas são as abordagens indicadas. O primeiro consiste na monitorização clínica e radiográfica das lesões sem intervenção, em animais assintomáticos, sem evidência de lesões ao exame clínico, mas com lesões radiográficas confinadas às raízes dentárias. A extração dos dentes afetados necessita de exame radiográfico antes e depois, de forma a garantir que todo o dente foi extraído. Quando as raízes estão extensamente reabsorvidas o clínico pode optar pela amputação da coroa dentária (Gorrel, 2015).

c. Doença periodontal

A doença periodontal (DP) consiste na inflamação do periodonto (DuPont, 2008). A doença periodontal inicia-se quando as bactérias da cavidade oral formam uma substância chamada placa bacteriana que adere à superfície dos dentes. Subsequentemente, os minerais da saliva mineralizam a placa formando o cálculo dentário, que se encontra firmemente aderido aos dentes. O verdadeiro problema desenvolve-se quando a placa e o cálculo ultrapassam a linha gengival. As bactérias nesta placa “sub-gengival” iniciam um ciclo de lesão aos tecidos de suporte do dente, levando, eventualmente, à perda do mesmo. Estas bactérias secretam toxinas que contribuem para lesão tecidual, estimulando o sistema imunitário do hospedeiro (American Veterinary Dental College, 1998).

A gengivite, seguida pela inflamação dos restantes tecidos periodontais, pode conduzir à inflamação crónica oral, bacteriémia esporádica, dor e em última análise, à perda dentária. Esta condição pode ser reversível e controlável desde que exista um controlo adequado da acumulação da placa dentária. Para tal, deve-se remover periodicamente o cálculo dentário e

promover a higienização oral através de escovagem diária dos dentes. Já a periodontite é uma condição progressiva e irreversível. O tratamento tem como objetivo o controlo da inflamação dos tecidos, que permite a recuperação da gengiva e previne a destruição do periodonto (Perry & Tutt, 2014).



Figura 6 – Imagem ilustrativa de DP num gato. Presença de abundante cálculo dentário.

d. Complexo Granuloma Eosinofílico

O complexo granuloma eosinofílico em gatos consiste num conjunto de três apresentações clínicas: a úlcera eosinofílica, a placa eosinofílica e o granuloma eosinofílico (White, 2003). A placa eosinofílica está normalmente localizada no abdómen ou nas coxas, apresentando-se como lesões circunscritas, redondas ou ovais. O granuloma eosinofílico consiste numa lesão nodular, que normalmente se encontra na parte posterior das coxas, na face ou na boca. Já a úlcera eosinofílica caracteriza-se por lesões ulcerativas, circunscritas, encontradas mais frequentemente no lábio superior (Tilley & Smith, 2011).

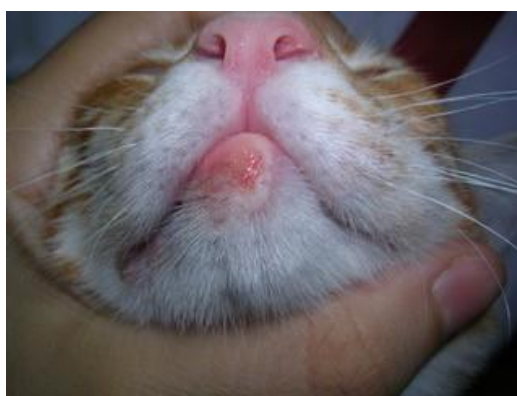


Figura 7 – Fotografia ilustrativa de uma úlcera eosinofílica num gato com 1 ano de idade. Fotografia gentilmente cedida por Lisa Mestrinho.

As lesões orais podem estar associadas a disfagia, sialorreia e halitose, embora, na maioria das vezes, sejam assintomáticas. O diagnóstico inclui a realização de um hemograma, testes para doenças retrovirais – vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia

felina (FeLV) - e punção aspirativa ou biópsia. A eliminação de possíveis agentes de hipersensibilidade através do controlo de pulgas e/ou utilização de dietas hipoalergénicas são usados na abordagem diagnóstica e incluídos no maneio médico destes animais (Mestrinho et al., 2015).

e. Gengivoestomatite Crónica em Gatos

A gengivoestomatite crónica felina (GECF) é uma das doenças inflamatórias orais mais importantes, devido à sua complexidade, gravidade e fraca resposta ao tratamento (Healey et al., 2007). Caracteriza-se por inflamação oral prolongada diferenciando-se da gengivite por ultrapassar a junção mucogengival e estender-se à mucosa (Lyon, 2005).

i. Etiopatogenia

A etiologia desta doença é ainda desconhecida, contudo aceita-se que a GECF é uma síndrome multifatorial, em que existe uma resposta imune exagerada a antígenos infecciosos ou não infecciosos (Quimby et al., 2008). Os agentes infecciosos até ao momento implicados na etiologia da GECF são: o Calicivírus Felino (CVF), o Herpesvírus Felino (HVF), o FeLV, o FIV, bactérias do género *Bartonella* e/ou eventualmente, uma variedade de outras bactérias ainda não identificadas. Entre as causas não infecciosas foram identificadas causas locais e sistémicas, nomeadamente doenças dentárias, tais como RD e DP; e, reações de hipersensibilidade do indivíduo à placa bacteriana ou a alérgenos alimentares. Os gatos que vivem em grupos parecem ser afetados mais cedo na vida, o que poderá estar correlacionado com níveis de stress mais elevados e proximidade com outros gatos, permitindo a transmissão de agentes infecciosos (Johnston, 2012).

O HVF e o CVF são vírus indutores de lesões tanto na cavidade oral como no aparelho respiratório superior, sendo que o primeiro, embora menos prevalente (5%), parece induzir um quadro clínico de maior gravidade do que o segundo. (Hennet, 2014). A alta prevalência do CVF parece estar relacionada com a diversidade antigénica do vírus assim como com a incapacidade das vacinas em proteger os animais contra todas as estirpes virais existentes (Green, 2012). Vários estudos demonstram que mais de 70% dos animais com GECF são positivos ao isolamento viral de CVF através de zaragatoa oral (Johnston, 2012), existindo mesmo autores a referirem uma incidência de 100% nesse isolamento. Contudo, este vírus é igualmente detetado em animais sem sinais clínicos. Embora não exista uma relação causal direta estabelecida entre o CVF e a GECF, vários estudos suportam este envolvimento (Quimby et al., 2008; Dowers et al., 2010; Belgard et al., 2010). Reubel, Hoffmann & Pedersen (1992)

isolaram diferentes estirpes de CVF de gatos com gengivoestomatite aguda ou crónica e inocularam-nas em gatos saudáveis, produzindo lesões de mucosite oral, na altura denominada de faucite. Estes autores não conseguiram reproduzir a GEFC em nenhum animal, sugerindo então que outros fatores poderiam estar envolvidos na etiopatogenia da doença. Recentemente, Druet e Hennes (2017) tentaram relacionar o CVF com a gravidade das lesões de 104 gatos com GEFC e com a resposta ao tratamento cirúrgico (extrações dentárias) e concluíram que não existia qualquer relação entre os parâmetros estudados. A presença de CVF não parece ser fator patogénico direto na GEFC, sendo, contudo, a resposta imune exacerbada ao vírus provavelmente importante na sua fisiopatologia (Norsworthy, 2011; Druet & Hennes, 2017).

A infeção por FIV pode ter um papel importante no aparecimento de lesões orais, predispondo o animal a infeções secundárias. Tanto a infeção por FIV como por FeLV podem contribuir para uma resposta imunitária aberrante a antígenos orais (Johnston, 2012). Num estudo efetuado em 2014, Kornya et al. associaram a doença oral com o risco aumentado de seropositividade para retrovírus em gatos naturalmente infetados, concluindo que gatos com GEFC devem ser testados para estes vírus.

Microscopicamente, estão presentes nos tecidos lesionados linfócitos, plasmócitos e em menor número, neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Winer et al., 2016; Arzi et al., 2010). Recentemente, foi descoberta a existência de células T *cluster of differentiation* (CD) 3+ no epitélio e na submucosa da mucosa oral afetada por GEFC e de células B CD20+ no estroma subepitelial (Arzi et al., 2016). Existe também um aumento da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm), em biópsias de gatos com GEFC, de mediadores inflamatórios específicos tais como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e Interferão-gama- γ (Harley et al., 1999).

A infiltração celular encontra-se associada a uma hipergamaglobulinémia, com aumento das concentrações séricas de IgG, IgM, IgA e albumina nos gatos com GEFC o que sugere uma predisposição destes animais para responderem de forma exuberante a ativadores dos linfócitos B policlonais, bactérias e partículas virais. Consequentemente, verifica-se uma resposta imunológica insuficiente para controlar os antígenos virais e bacterianos, mas suficientemente expressiva para produzir uma inflamação crónica local (Niza, Mestrinho & Vilela, 2004; Winer et al., 2016).

ii. Prevalência

A prevalência reportada da GEFC varia de 0,7% (Healey et al., 2007) a 12% (Verhaert & Wette, 2004). Tendo em conta o estudo publicado na revista Veterinária Atual, apresentado em 2016 e baseado numa amostra de 1250 entrevistas presenciais, estimou-se que existem cerca

de 6,7 milhões de animais de estimação no nosso país, em que 20% são gatos. Assim, dos 1.3 milhões de gatos de estimação em Portugal, estima-se que entre 9,3 mil a 15,6 mil gatos poderão sofrer de GECF (Pinto, 2016).

iii. Sinais clínicos

Os sinais clínicos da GECF dependem da gravidade das lesões (Robson & Crystal, 2011). Os gatos podem não demonstrar sinais clínicos e, por conseguinte, a doença ser apenas detetada acidentalmente durante o exame físico. Quando apresentam sinais de dor e inflamação oral estes incluem: hiporrexia (por vezes anorexia), perda de peso, halitose, sialorreia (por vezes tingida de sangue), diminuição do comportamento de higiene, dor ao abrir a boca, dificuldade na preensão do alimento, disfagia, alterações na preferência de alimento seco para alimento húmido, alteração comportamental como irritabilidade e diminuição da atividade física (Bellei et al., 2008; Lommer, 2013; Winer et al., 2016; Squarzoni et al., 2017). A qualidade de vida pode ser gravemente afetada ao ponto de os donos optarem pela eutanásia (Healey et al., 2007; Arzi et al., 2016; Dolieslager et al., 2011).

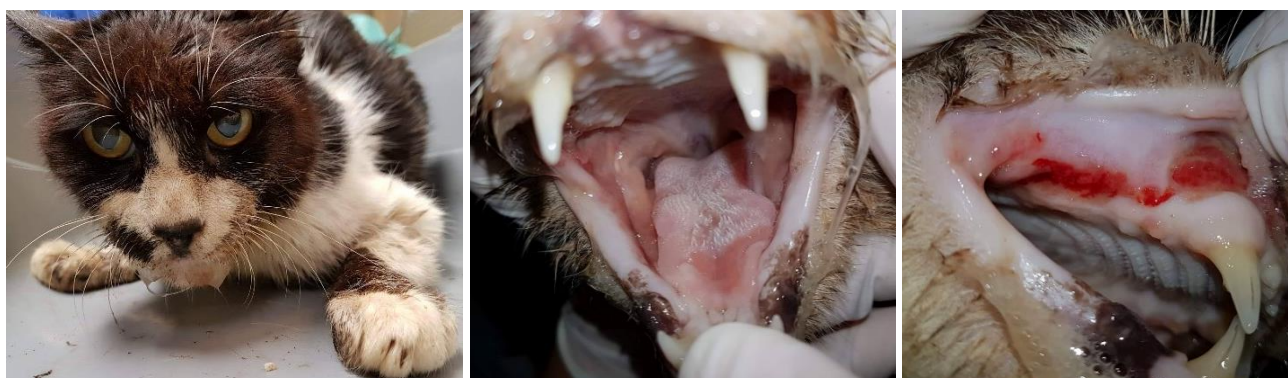


Figura 8 – Gato, macho, 9 anos de idade, com gengivoestomatite crónica. As fotografias ilustram os sinais clínicos como ptialismo e pêlo em mau estado (à esquerda), assim como diferentes tipos de lesões: mucosite caudal e ulceração lingual (no meio), e **estomatite** marcada junto ao dente 104 (à direita).

O exame físico de gatos com GECF revela uma inflamação da mucosa oral grave e desproporcional comparativamente com a acumulação de cálculo dentário e com a doença dentária visível. Podem também apresentar linfadenomegália mandibular.

As lesões estão frequentemente concentradas na parte caudal da boca, envolvendo os arcos palatoglossos, com extensão rostral ao longo da mucosa bucal e gengival, atravessando a junção mucogengival. Existem dois padrões lesionais clássicos: erosivo e/ou proliferativo, que afetam lateralmente os arcos palatoglossos (Winer, Arzi & Verstraete, 2016). A faringe e o palato mole podem também estar envolvidos, e menos frequentemente o palato duro e a língua

(Healey et al., 2007).



Figura 9 – Gato, macho, 2 anos de idade com gengivoestomatite crónica. A fotografia ilustra a exuberante **estomatite** e mucosite caudal, envolvendo os arcos palatoglossos.

iv. Diagnóstico

Gatos com GECF exigem uma avaliação detalhada, com vários exames complementares de diagnóstico antes de se iniciar qualquer tratamento (Gorrel, 2008).

Assim, para diagnóstico primário requerem-se: história detalhada com registo dos sinais clínicos já descritos e exame físico completo (Winer et al., 2016); análises clínicas (hemograma, bioquímicas e urianálise); avaliação dentária completa e exame radiográfico intra-oral sob anestesia geral, para diagnóstico de doença periodontal, lesões de reabsorção e outras causas de inflamação, identificação de perda de osso alveolar e raízes retidas; biópsia gengival para histopatologia, de modo a obter-se um diagnóstico definitivo e para a eliminação de outras causas de gengivoestomatite como neoplasias, doenças auto-imunes, queimaduras, granulomas eosinofílicos ou processos infecciosos; análises para descartar infeções retrovirais e calicivírus. Metade dos gatos GECF apresenta hiperproteinémia devido a hiperglobulinémia. Devem ainda ser descartadas outras doenças sistémicas que possam predispor para infeção, como a diabetes mellitus (Niza et al., 2004; Robson & Crystal, 2011; Gorrel, 2008).

Em casos refratários sugere-se a realização de cultura bacteriana de anaeróbios através de uma colheita retirada do sulco gengival (Robson & Crystal, 2011).

Uma variante da doença é encontrada em jovens adultos durante a erupção de dentes definitivos (cerca de 4 a 6 meses de idade), chamada de gengivite juvenil. Esta inflamação está geralmente limitada à gengiva junto aos dentes pré-molares e molares. Nesta variante os animais respondem favoravelmente à terapêutica com anti-inflamatórios e higiene local, sendo que a inflamação se resolve completamente após alguns meses (Robson & Crystal, 2011).

v. Tratamento

É de conhecimento geral que a GECCF é uma doença de manejo difícil, dispendioso e com poucas opções terapêuticas, tornando-se frustrante para os clínicos e tutores (Rolim et al., 2017).

Os tutores devem ser alertados sobre a dificuldade em alcançar uma resolução eficaz apesar da terapêutica escolhida. A terapêutica pode-se dividir em terapêuticas médicas ou cirúrgicas (Robson & Crystal, 2011).

A terapêutica médica tradicionalmente utilizada é a imunossupressão (por exemplo com o uso de corticosteroides ou ciclosporina), enquanto que a terapêutica cirúrgica envolve a extração dentária total ou parcial. Diversos autores que realizaram revisão sistemática sobre este tema concordaram que o tratamento de eleição é extração de todos os dentes, ou, extração parcial, que inclui todos os dentes pré-molares e molares (Arzi et al., 2016; Jennings et al., 2015). A escolha pela extração total ou parcial é deixada ao critério do clínico, visto que, segundo estudos recentemente realizados, não existe diferença significativa na resposta ao tratamento entre os grupos estudados (Jennings et al., 2015). A realização de exame radiográfico intra-oral é essencial para a avaliação de todas as estruturas dentárias, antes e após as extrações, bem como a avaliação dos seios perinasais e presença ou não de fístulas oro-nasais (Lyon, 2005).



Figura 10 – Fotografia ilustrativa do posicionamento radiográfico (à esquerda) e radiografia da projecção inferior dos incisivos mandibulares (à direita). Fotografia gentilmente cedida por Lisa Mestrinho.

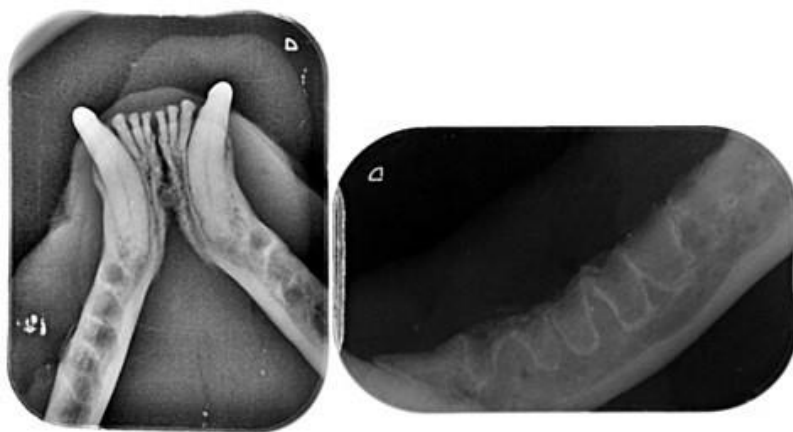


Figura 11 – Radiografias ilustrativas após extrações dentárias.

Como a presença de placa bacteriana oral parece contribuir para persistência da inflamação na GEFCF (Gracis, 2015), é requerido a diminuição da mesma através de métodos mecânicos, como a escovagem dentária diária. Contudo esta prática é de difícil adesão em gatos com dor oral (Jennings et al., 2015). Assim a extração de dentes parece ser o método mais eficaz, ao reduzir a superfície de retenção de placa com consequente diminuição da inflamação oral. Demonstrou-se que 39% dos gatos com estomatite crônica têm uma melhoria significativa após as extrações dentárias e que 28.4% chegam à resolução completa da estomatite. Existe, contudo, numa grande percentagem destes últimos dois casos (68.8%), a necessidade de associar terapêutica médica após a cirurgia para que se atinjam resultados favoráveis (Jennings et al., 2015). Lewis, Tsugawa, Reiter, (2007) referem a utilização de laser de dióxido de carbono como tratamento adjuvante às extrações dentárias, para remover o tecido proliferativo e estimular a fibrose.

O controlo da dor deve ser sempre realizado enquanto componente de qualquer abordagem médica ou cirúrgica, utilizando anti-inflamatórios não esteroides e/ou opiáceos, nomeadamente a buprenorfina (agonista parcial dos recetores morfínicos $\mu[\mu]$) com absorção oral em gatos e de fácil administração (Steagall et al., 2014). Os tutores devem ser encorajados a escovarem os dentes do seu animal assim que a dor e a inflamação estejam controladas, associando a aplicação de géis antibacterianos à base da clorexidina. Pode ser necessário fornecer suporte nutricional após a cirurgia, a curto ou médio prazo, sendo que, em casos graves, a colocação de um tubo de esofagostomia para alimentação assistida pode ser uma medida necessária. A hospitalização do gato após as extrações dentárias deve ser evitada pois a maioria dos gatos alimenta-se melhor em casa, com os seus tutores a estimularem o apetite, oferecendo-lhes comida húmida durante 3 a 5 dias após a cirurgia. Nalguns casos pode ser necessário oferecer dieta de convalescença no período pós-operatório (Johnston, 2012).

Ao tratamento cirúrgico deve ser associado tratamento médico, especialmente em casos

refratários (Lommer, 2013). Após as extrações dentárias, cerca de 10% dos gatos não apresentam qualquer resposta a este tratamento (Hennet et al., 2011) e cerca de 26% dos gatos apresentam apenas pequenas melhorias após o mesmo associado a terapêutica de suporte médico (Jennings et al., 2015). O manejo médico com antibioterapia, como amoxicilina, associação de amoxicilina e ácido clavulânico, clindamicina e metronidazol (Lobprise, 2012), são frequentemente utilizados. Contudo, a resolução dos sinais clínicos a longo prazo raramente ocorre (Jennings et al., 2015), sendo muitas vezes necessário a combinação com glucocorticóides, por vezes em vários ciclos de tratamento (Lobprise, 2012). Os glucocorticóides ajudam a diminuir a inflamação, a reduzir a dor e a estimular o apetite (Hennet et al., 2011). O fármaco mais utilizado é a prednisona ou prednisolona na dose de 0,5 a 1 mg/kg por via oral (Reiter, 2016). Os glucocorticóides continuam a ser o fármaco mais prescrito para o manejo da estomatite refratária, ainda que a sua administração nem sempre resulte em melhoria clínica dos animais, e pode ter efeitos secundários indesejáveis como seja: alterações comportamentais, poliúria, polidipsia e a possibilidade de desenvolver diabetes mellitus (Reiter, 2016). Os glucocorticóides têm diversos efeitos no sistema imunitário, como sejam a diminuição da diapedese dos neutrófilos, redistribuição dos linfócitos pelos compartimentos extravasculares e a diminuição da regulação da maturação células apresentadoras de antígenos (Tizard, 2013). Já os efeitos da ciclosporina estão preferencialmente direcionados para as células T e em menor extensão para as células B. Como as células predominantemente encontradas na estomatite são os linfócitos e os plasmócitos, faz sentido explorar-se a utilização de ciclosporina como tratamento nestes animais (Papich, 2018). Num estudo com 16 gatos, Lommer (2013) mostrou que a administração de ciclosporina por via oral é bem tolerada e efetiva na redução da inflamação oral dos gatos com estomatite refratária. Os gatos desse estudo não receberam o produto comercial, mas sim uma formulação líquida microemulsificada usando uma base oleosa de sabor a atum, melhorando a biodisponibilidade do produto.

Têm sido estudadas outras terapêuticas imunomoduladoras como sais de ouro, lactoferrina bovina e mesmo talidomida (Lommer, 2013), com resultados inconsistentes, não estando, por isso, atualmente recomendados. É necessário garantir suporte nutricional de grande qualidade para encorajar uma resposta imunológica efetiva e uma boa cicatrização após extrações dentárias. Várias dietas e suplementos têm sido sugeridos, mas os estudos que existem não são suficientes para as recomendações específicas (Johnston, 2012).

O interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) encontra-se disponível em Portugal. A utilização deste fármaco encontra-se relatada com resultados positivos em animais refratários ao tratamento cirúrgico (Southerden & Gorrel, 2007; Hennet et al., 2011). A administração diária de 0,1 μ de rFeIFN- ω está associada a melhoria significativa das lesões

clínicas (estomatite e mucosite caudal) e diminuição da dor oral, equivalente aos resultados clínicos obtidos com o tratamento de curta duração com prednisolona em gatos refratários às extrações dentárias (Henner et al., 2011). Os interferões são citocinas que pertencem ao mecanismo de defesa do sistema imunitário não específico e que defendem o organismo de infecções virais por vários mecanismos. Os interferões possuem diversas funções, como por exemplo: indução de resistência à replicação viral em células não afetadas, ativando genes que causam a destruição do Ácido Ribonucleico mensageiro (ARNm) e inibindo a transcrição de proteínas virais e de algumas proteínas do hospedeiro; indução de citocinas para o recrutamento de linfócitos e ativação de células dendríticas, macrófagos e células *natural killer* (Murphy & Weaver, 2017). Para além da administração de rFeIFN- ω oral ou subcutâneo, é também possível a administração intralesional, com a injeção de 0,1 ml subgengival nas zonas de maior inflamação (sobretudo na orofaringe). As injeções locais devem ser associadas com a aplicação subcutânea, podendo-se repetir o tratamento após 2-6 meses, nos casos mais graves (Mihaljevic, 2003). Um estudo em 2014 de Leal, R., comparou o protocolo subcutâneo como o protocolo por via oral no tratamento de gatos com infeção por FIV, demonstrando uma diminuição da IL-6 no primeiro protocolo.

Como a infeção por CVF é ubíqua e pode contribuir para a GEFC (Southerden & Gorrel, 2007), a vacina para CVF deve ser incluída no conjunto de vacinas administradas em todos os gatos saudáveis. Contudo, há que ter em mente que a vacinação apenas protege os animais dos sinais clínicos agudos, não previne a infeção e a excreção do vírus, e que não protege contra todas as estirpes (Radford et al., 2006). A vacinação não oferece uma proteção completa a animais com o sistema imunitário comprometido, como aqueles que têm: défices nutricionais, imunodeficiências genéticas ou virais adquiridas, doenças sistémicas, os que estão a receber fármacos imunossupressores, citostáticos ou sob influência de stress (Pedersen & Hawkins, 1995). Se não for possível proteger um animal imunocomprometido à exposição a agentes infecciosos, então a vacinação deve ser igualmente administrada, sendo recomendadas vacinas inativadas, sob o risco de se desenvolverem sinais clínicos de CVF caso sejam administradas vacinas vivas (Radford et al., 2009).

3. SÍNDROME ASSOCIADA A DOENÇAS ORAIS

a. Síndrome de dor orofacial felina

A síndrome de dor orofacial felina (SDOF) é uma afeção dolorosa em gatos com sinais de desconforto oral e mutilação da língua. Suspeita-se que seja uma doença de dor neuropática

com predominância na raça Birmanesa, tendo algum padrão de hereditariedade, e, envolvendo, provavelmente, o processamento central ou ganglionar da informação sensorial do nervo trigêmio (Rusbridge et al., 2010). Esta doença caracteriza-se por episódios de desconforto tipicamente unilaterais, intervalados por períodos sem sinais de dor. Estas alterações de sensibilidade do nervo trigêmio parecem ser consequência da doença oral normalmente coexistente, sendo a erupção dentária um importante fator na etiologia. A SDOF aparenta ser resistente aos analgésicos habitualmente utilizados, pelo que por vezes é necessário o uso de terapêutica anticonvulsiva, para atingir o sucesso terapêutico (Rusbridge et al., 2010).

4. RESPOSTA AGUDA À INFLAMAÇÃO

A inflamação ocorre quando a homeostase do indivíduo fica comprometida, quer seja por invasão de microrganismos, quer por lesão celular ou proliferação neoplásica com resposta local ou sistêmica. Quando a inflamação é limitada, os efeitos sistêmicos são mínimos. Contudo, quando esta atinge vários órgãos, os efeitos sistêmicos começam a ser notórios. Estes efeitos, derivados da resposta imunitária inata, manifestam-se por fadiga, hiporréxia, mialgias, artralgias e pirexia. O objetivo da resposta aguda é restaurar a homeostasia e eliminar a causa subjacente ao desequilíbrio, o mais depressa possível (Cerón, Eckersall & Martinez-Subiela, 2005).

Os padrões moleculares dos microrganismos invasores são reconhecidos por recetores das células fagocíticas, estimulando a produção de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), citocinas pró-inflamatórias que atuam em vários órgãos, sinalizando a alteração da homeostase. Estas citocinas irão induzir a expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no hipotálamo, resultando na produção de prostaglandinas, que causam aumento do ponto termoestático do corpo. Iniciam-se conseqüentemente medidas de conservação da temperatura corporal, tais como a vasoconstrição, os tremores musculares e a febre. O animal pode apresentar letargia, não só pela febre, mas também devido à libertação de moléculas indutoras do sono, mediada pelas citocinas inflamatórias, em especial pela IL-1 (Tizard, 2013a).

Passados 90 minutos após a lesão celular ou invasão por microrganismos, os hepatócitos aumentam a síntese e libertação de novas proteínas, sob influência da IL-1 β , TNF- α , e em especial da IL-6, situação que se continuará até 48 horas da ocorrência. Como este evento ocorre na sequência de infeções e inflamações agudas, estas proteínas produzidas sobretudo pelos hepatócitos, mas também por linfonodos, tonsilas, baço e leucócitos, são chamadas de proteínas de fase aguda (PFA), (Figura 12) (Tizard, 2013a).

a. Proteínas de fase aguda

As PFA são proteínas plasmáticas cuja concentração se altera perante a resposta inflamatória aguda, podendo aumentar (PFA positivas) ou diminuir (PFA negativas) (Paltrinieri et al., 2007).

Existem três grandes grupos de PFAs baseados na magnitude (Bochsler & Slauson, 2002; Murata, Shimada & Yoshioka, 2004; Petersen, Nielsen & Heegaard, 2004; Cerón et al., 2005) e duração da sua resposta a um estímulo: as que são caracterizadas por aumentos de 10 a 1000 vezes em humanos ou 10 a 100 vezes em animais domésticos – por exemplo a proteína C reactiva e a amiloide sérica A (SAA); as que aumentam 2-10 vezes – por exemplo a

haptoglobina (Hp) e as alfa-globulinas; e aquelas cujas concentrações diminuem com estímulos inflamatórios - exemplo a albumina (Kann et al., 2012).

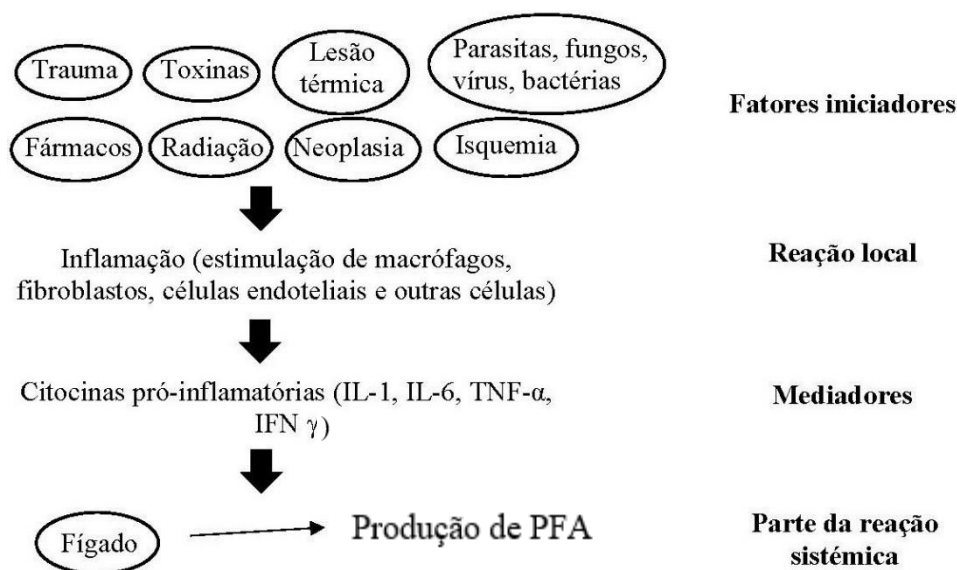


Figura 12 – Mecanismos da produção de PFA pelos hepatócitos. Segundo Cerón et al. (2005).

i. Proteínas de fase aguda positiva

A maioria das PFA positivas são glicoproteínas sintetizadas maioritariamente pelos hepatócitos sob estímulo das citocinas pro-inflamatórias, sendo libertadas na corrente sanguínea (Cerón et al., 2005).

A sua produção e resposta varia consoante a espécie. Nos cães, a proteína C reativa é uma proteína que aumenta de forma exuberante, enquanto que, no gato, a mesma não tem aumentos significativos após um estímulo inflamatório (Kajikawa et al., 1999).

Nos gatos, os níveis da SAA aumentam 10 a 50 vezes em estados inflamatórios, como no caso de doenças infecciosas, mas também em neoplasias e doenças metabólicas (Tizard, 2013a). A alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) também surge aumentada a nível sanguíneo, aquando de peritonite infecciosa felina (PIF), infeções por calicivírus, clamídiase, FeLV e FIV, mas em menor escala, com aumentos inferiores a 10 vezes o valor basal. A haptoglobina, também chamada de alfa-2 glicoproteína, aumenta cerca de 2 a 10 vezes o seu valor basal em estados inflamatórios, estando especialmente alta na PIF (Tizard, 2013a).

Todas as PFA positivas possuem múltiplas funções em que se incluem a modulação do sistema imunitário, o transporte de proteínas e a proteção dos tecidos às lesões causadas pelos processos inflamatórios (Murata et al., 2004).

ii. Proteínas de fase aguda negativa

A resposta de fase aguda pode causar alterações em mais de 200 proteínas. A albumina é a maior PFA negativa, significando que a sua concentração sanguínea diminui durante a resposta de fase aguda. Este decréscimo pode dever-se ao aumento da excreção da proteína, por alterações hepáticas ou renais, ou à diminuição da sua síntese pelos hepatócitos (Cray, Zaias & Altman, 2009). Durante a resposta de fase aguda, a síntese de albumina diminui havendo maior disponibilidade de aminoácidos para a síntese de PFA positivas (Paltrinieri, 2007a).

Outros exemplos de PFA negativas são a transferrina, transtirretina, a proteína ligadora de retinol e a proteína ligadora de cortisol, tratando-se de proteínas que estão envolvidas no transporte de hormonas e de vitaminas (Jain, Gautam & Naseem, 2011).

a. Uso das Proteínas de fase aguda na monitorização de doenças

Ao contrário das citocinas, que devido à sua pequena dimensão, são rapidamente filtradas pelo rim, as proteínas de fase aguda possuem uma massa molecular superior (maior que 45kDa), pelo que, a sua permanência plasmática é mais prolongada (Salgado et al., 2011).

As PFA mais utilizadas para monitorização de doenças são a proteína C reativa, a SAA, a AGP, a Hp e a albumina (Kann et al., 2012). O doseamento dos níveis de PFA não constituem por si um exame complementar de diagnóstico, visto que as alterações das suas concentrações apenas nos indicam a presença de uma doença inflamatória ou infecciosa. Contudo, ao comparar os níveis das PFA em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais, estas podem ajudar na deteção de inflamação subclínica, na distinção entre doença aguda e crónica, e no prognóstico da doença (Horadagoda et al., 1999; Petersen et al., 2004; Céron et al., 2005). Em regra geral, o grau de alteração na concentração das PFA correlaciona-se com a gravidade da doença, sendo estas alterações mais extremas em casos mais graves. Como a resposta de fase aguda acontece antes de qualquer resposta imunológica, esta pode ser utilizada como marcador precoce de doença (Petersen et al., 2004; Céron et al., 2005).

O doseamento das proteínas de fase aguda ainda não é rotineiramente utilizado na medicina veterinária. Este facto deve-se provavelmente à escassez de testes disponíveis comercialmente, sendo, os que existem, onerosos, e ainda devido à falta de estudos sobre a sua sensibilidade e especificidade (Salgado et al., 2011).

Até agora e pelos estudos publicados, o doseamento das PFA, em conjunto com sinais clínicos e outros meios complementares de diagnóstico, verificou-se útil para o manejo e prognóstico de doenças como: PIF, doença inflamatória intestinal canina, piómetra canina,

leishmaniose, mastite bovina e doença respiratória equina (Kann et al., 2012).

5. ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA

A AGP (também referida como orosomucóide) pertence à classe das alfa-1 globulinas e foi descrita pela primeira vez em 1920 por Schmid, Winzler e seus colegas, revelando-se ser uma proteína bastante peculiar, com um baixo ponto isoelétrico e alto teor de hidratos de carbono (45%). De facto, até 1980, a AGP foi considerada a proteína com maior teor em hidratos de carbono, ano em que foi descrita a galactoproteína com 76% destes (Fournier, Medjoubi-N & Porquet, 2000).

Em 1977, Twining e Brecher identificaram, por técnicas imunológicas, AGP, anti-trombina III e alfa-2-macroglobulina como componentes de 90 g da fração sobrenadante de um tumor maligno mamário, gástrico, do íleo, do cólon e de tecidos anais humanos. Embora a associação entre o cancro e a AGP seja bem conhecida, outros autores reportaram que a AGP era detetável através de técnicas imunohistoquímicas, em tecido normal, como por exemplo, no miocárdio humano. Em 1978, Gahmberg e Andersson descreveram a existência de anticorpos específicos para a AGP humana (Fournier et al., 2000).

Embora a proteína C reactiva, a Hp, e a SAA sejam consideradas as proteínas de fase aguda mais importantes no homem e em alguns animais, existem poucos estudos disponíveis para gatos. Foi realizado um estudo, 1999, com o objetivo de avaliar as alterações das PFA no gato, comparando animais clinicamente saudáveis e gatos hospitalizados, sujeitos a inflamação induzida ou a procedimentos cirúrgicos. A concentração sérica da SAA, da AGP e da Hp dos gatos hospitalizados era cerca de 7 a 11 vezes superior ao dos gatos saudáveis. Contudo a concentração sérica da proteína C reactiva felina não se alterou significativamente entre os dois grupos. Aquando da inflamação induzida, a SAA era a primeira PFA a ter aumentos da sua concentração sérica, seguindo-se pouco tempo depois pelo aumento da concentração da AGP. Neste estudo, os autores concluíram que a SAA é a primeira proteína a ser detetada numa fase precoce de inflamação (Kajikawa et al., 1999).

São vários os autores a afirmar que a AGP, a SAA e a Hp são indicadores úteis para monitorizar a resposta aguda inflamatória no gato (Winkel et al., 2015; Paltrinieri et al., 2007; Kajikawa et al., 1999) (Tabela 5) havendo os que chegam mesmo a afirmar que a AGP é a proteína de fase aguda mais importante nesta espécie (Paltrinieri et al., 2007).

Tabela 5 – Principais PFA relacionadas com o diagnóstico de doenças em gatos. Segundo Gómez-Laguna et al. (2011).

	Doença	Proteína de Fase Aguda	Referência
Inflamação	Pancreatite	SAA	Tamamoto et al. (2008)
	Amiloidose reativa	AGP, SAA, Hp	Kajikawa et al. (1999)
	IR e FLUTD	SAA	Sasaki et al. (2003)
	Abcessos e piotórax	AGP, Hp	Ottenjann et al. (1996)
	Lesões e doença hepática	SAA	Sasaki et al. (2003)
	Cirurgia	AGP, SAA, Hp	Kajikawa et al. (1999)
Bactérias	<i>Chlamydophila psittaci</i>	AGP	Terwee et al. (1998)
Vírus	PIF	AGP, SAA, Hp	Duthie et al. (1997) Giordano et al. (2004) Paltrinieri et al. (2007)
	FeLV	AGP, Hp	Duthie et al. (1997)
	FIV	AGP	Korman et al. (2012)
	Parvovirose	AGP	Paltrinieri et al. (2007)
	CVF	AGP	Terwee et al. (1997)
Neoplasias	Linfoma	SAA, AGP	Selting et al. (2000) Sasaki et al. (2003) Tamamoto et al. (2008)
	Mesotelioma maligno		
	Carcinoma		
	Sarcoma		
Endócrino	Hipertiroidismo	SAA	Sasaki et al. (2003) Tamamoto et al. (2008)
	Diabetes mellitus		
Autoimune	Anemia hemolítica autoimune	SAA	Paltrinieri et al. (2007) Tamamoto et al. (2008)
	Doença poliquística		

a. A estrutura da AGP

A AGP é o maior componente proteico da porção seromucoide do plasma, a fração mais resistente à precipitação ácida (Selting et al., 2000; Winkel et al., 2015). Constitui uma das proteínas plasmáticas mais glicosada, com uma massa molecular de aproximadamente 43kDa, com 45% de ligações covalentes a hidratos de carbono. Estas cadeias ramificadas de hidratos de carbono são compostas de monossacáridos ligados entre si, tais como manose, galactose, glucose, e ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) sendo normalmente este o último elemento da cadeia. Assim os grupos carregados negativamente estão localizados no fim de cada cadeia resultando num baixo ponto isoelétrico da AGP, com um valor de pH entre 2,8 a 3,8 (Eckersall, 2008).

Podem distinguir-se diferentes formas plasmáticas de AGP que dependem do tipo de glicosilação e da substituição de múltiplos aminoácidos, sendo que o padrão de glicosilação pode alterar-se com o tipo de inflamação (Fournier et al., 2000; Hochepped et al., 2003). Os hidratos de carbono da AGP têm sido alvo de forte investigação pois é uma das poucas glicoproteínas plasmáticas que contêm uma estrutura ligada a N-tetra antenária tal como di- e tri-antenária. Teoricamente, a sua estrutura altamente diversificada daria origem a mais de 105 formas diferentes de AGP, cada um dos cinco locais de glicosilação com uma combinação única. Contudo tal não se verifica, porque, o local 1 de glicosilação nunca permite a ligação de um glicano de estrutura N-tetra antenária, o local 2 nunca permite a ligação de glicanos com fucose (um desoxiaçúcar), o local 4 nunca se liga a glicanos di-antenários, e só o local 4 e 5 de glicosilação permitem a ligação de glicanos tetra-antenários com mais do que uma fucose.

Outra das características notáveis da AGP é a sua alta solubilidade, tanto em água como em muitos solventes orgânicos polares (Fournier et al., 2000).

b. A síntese da AGP

A AGP, tal como a maioria das proteínas de fase aguda, é maioritariamente sintetizada no fígado e secretada pelos hepatócitos, sendo a sua expressão regulada por várias citocinas pro-inflamatórias anteriormente referidas (Schönfeld, Ravelli, Mueller & Skerra, 2008).

Foi, no entanto, demonstrado que os linfócitos produzem AGP, o que pode explicar os seus níveis séricos elevados em cães e gatos com linfoma. A produção extrahepática de AGP em humanos tem sido descrita em órgãos como no rim, no intestino, no coração e em diferentes tipos de glóbulos brancos. A AGP também pode ser produzida pela próstata, estando presente no líquido seminal (Cerón et al., 2005).

c. Mediadores da inflamação indutores da síntese de AGP

As PFA positivas estão divididas em duas grandes classes, dependendo da sua resposta a citocinas. As PFA do tipo 1, onde se incluem a AGP, o componente 3 do complemento, a SAA, a proteína C reativa, a Hp e a hemopexina, são reguladas pela IL-1, IL-6, TNF- α mas também por glucocorticoides. As do tipo 2, que incluem as três cadeias de fibrogénio e diversas proteases inibidoras, são reguladas por citocinas do tipo IL-6 e glucocorticoides (Baumann et al., 1990; Baumann & Gauldie, 1994). Tem sido demonstrado que outra interleucina, a IL-8 também aumenta a produção hepática de AGP humana (Fournier et al., 2000).

A IL-1 é uma citocina, cuja família pode ser dividida em subfamílias, de acordo com o comprimento do seu precursor e o comprimento da porção final de cada precursor, sendo então divididas nas subfamílias IL- α , IL- β e IL-33 (Paul & William, 2013). Aquando de um estímulo inflamatório as células sentinelas, como os macrófagos, produzem IL-1 α e IL-1 β , sendo que a IL-1 β é produzida em quantidades muito superiores, cerca de 10 a 50 vezes mais do que a IL-1 α . Enquanto que a IL-1 β é secretada, a IL-1 α mantém-se ligada aos macrófagos, atuando apenas quando existe contacto direto entre as células. Tal como a TNF- α , a IL-1 β atua nas células envolventes para iniciar e amplificar a inflamação, e nas células endoteliais vasculares permitindo a sua adesão aos neutrófilos (Tizard, 2013a). Ao contrário de outras citocinas, como a IL-2, que têm um efeito direto na função, diferenciação e expansão de linfócitos, a maioria dos membros da família da IL-1 não possui este efeito. A capacidade da IL-1 em induzir macrófagos a sintetizarem mediadores como a COX-2, fosfolipase A do tipo 2 e a sintetase de óxido nítrico 2 (NOS2) é dependente da produção de prostaglandina-E2, de fator ativador das plaquetas e de óxido nítrico, tendo assim uma função indireta. Para além da indução de citocinas, o IL-1 β promove a infiltração de células inflamatórias e imunocompetentes da circulação para o espaço extravascular e depois para os tecidos, onde a remodelação tecidual é o resultado da inflamação crónica induzida pela IL-1. A IL-1 β é também um fator angiogénico, tendo um papel importante na metástase de tumores e na formação de vasos sanguíneos (Dinarello, 2009).

A IL-6 é produzida por macrófagos, mastócitos, células vasculares endoteliais e fibroblastos. A sua produção é despoletada por endotoxinas bacterianas, IL-1 e por TNF- α (Tanaka, Narazaki & Kishimoto, 2014). A IL-6 está envolvida não só na ativação do sistema imunitário, mas também em processos regenerativos e na regulação do metabolismo, na manutenção da homeostase óssea e em muitas funções neuronais (Scheller et al., 2011). Esta induz a síntese hepática de uma variedade de outros mediadores inflamatórios, estimula a produção de neutrófilos pela medula óssea e promove ainda a diferenciação de células T auxiliares produtoras de IL-17 (Abbas, Lichtman & Pillai, 2015).

O TNF- α , foi originalmente caracterizado pela sua habilidade em induzir apoptose de células tumorais, sendo agora considerado o mediador central de uma grande variedade de atividades biológicas. Estas atividades englobam efeitos benéficos para o hospedeiro, tanto nas respostas inflamatórias como nas respostas imunitárias, contra uma variedade de agentes infecciosos. Em combinação com a IL-1, medeiam alterações nas células vasculares endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Um aumento local do TNF- α produzirá sinais clássicos de inflamação, que incluem o calor, rubor, tumor e dor. Já em circulação este fator pode diminuir o débito cardíaco, induzir trombose microvascular e causar extravasamento capilar. Ao atuar nos neutrófilos (a chave para a defesa celular aquando da inflamação), faz a chamada dos mesmos para os locais lesados, aumentando a sua aderência ao endotélio vascular e desencadeando as suas capacidades para eliminar microrganismos. Estimula ainda a fagocitose dos macrófagos, a produção de oxidantes e promoção/amplificação da inflamação. Esta última, ocorre por estimulação de mastócitos e de macrófagos, havendo produção de outros mediadores, como o NOS2 e a COX-2 (Abbas et al., 2015). Por outro lado, os membros da família do TNF- α exercem efeitos lesivos no hospedeiro no caso de sépsis, caquexia em casos tumorais e em doenças autoimunes (Pfeffer, 2003). A TNF é produzida por macrófagos, monócitos e células dendríticas (Abbas et al., 2015).

A IL-1, IL-6 e TNF- α ativam os hepatócitos para sintetizar as PFA, alterando o perfil de proteínas que eles produzem e secretam no sangue (Murphy & Weaver, 2017).

Os glucocorticóides são dos agentes imunossuppressores e anti-inflamatórios mais frequentemente utilizados. Estes agentes suprimem tanto os processos imunológicos como os processos inflamatórios. No sistema imunitário, os glucocorticóides atuam em quatro áreas: afetam a produção e circulação de leucócitos, influenciam os mecanismos dos linfócitos, modulam a atividade dos mediadores inflamatórios, e modificam o metabolismo das proteínas, dos carboidratos e da gordura. A produção por parte dos macrófagos, de prostaglandinas e citocinas, como por exemplo de IL-1, é reduzida na presença de glucocorticóides. Os glucocorticóides suprimem a resposta inflamatória aguda. Possuem dupla função: (1) estimulação de hepatócitos dependente de glucocorticóides através da IL-6; e, (2) diminuição da síntese de citocinas pelos monócitos e macrófagos (Baybutt & Holsboer, 1990). A resposta de fase aguda observada é o resultado destas complexas interações (Gruys et al., 2005). Inibem ainda o aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação, prevenindo a formação de edema e a deposição de fibrina, bloqueiam a migração de leucócitos dos capilares, inibem a libertação de enzimas lisossômicas e impedem o processamento de antígenos pelos macrófagos (Tizard, 2013a).

d. Funções da AGP

A AGP pertence à superfamília das lipocalinas, um grande grupo de proteínas cujas estruturas e funções são muito diversificadas, mas que inicialmente foram classificadas de proteínas transportadoras. Possuem papéis importantes no transporte de vitamina A1, de quimiorreceptores do olfato e de feromonas, na síntese enzimática de prostaglandinas, tal como na regulação da resposta imunitária e mediação da homeostase celular (Flower, 1996). Dadas estas funções, durante a inflamação, o aumento da concentração plasmática destas proteínas pode ter implicações a nível farmacocinético de algumas substâncias ativas, como por exemplo do fenobarbital, de propranolol ou da heparina, alterando-se a concentração livre destas no sangue (Cerón et al., 2005).

Embora exista um elevado número de artigos publicados sobre a AGP desde 1950, ainda não é conhecida a sua verdadeira função no organismo (Fournier, 2000). A maioria dos estudos com AGP, realizados *in vitro*, sugeriram que esta proteína possui um papel anti-inflamatório e imunomodulador (Williams et al., 1997). Esta inibe a agregação plaquetária, a ativação de neutrófilos (Vasson et al., 1994) e a proliferação de linfócitos sanguíneos periféricos, aumenta a secreção de um inibidor da IL-1 através de macrófagos (Bories et al., 1990; Tilg et al., 1993) e modula a secreção de citocinas pelos macrófagos-monócitos induzidas por lipopolidossacáridos dos agentes invasores (Boutten et al., 1992).

Subsequentemente à lesão vascular, ocorre a aderência de plaquetas no colagénio subendotelial e a libertação de adenosina-difosfato (ADP), serotonina e tromboxano A₂. Estes agentes são bastante potentes na ativação das plaquetas, resultando na agregação da camada inicial. Os fosfolípidos da superfície plaquetária estão então disponíveis para a ativação catalítica das proteínas do sistema de coagulação, levando à formação de trombina que induzirá ativação, libertação e recrutamento plaquetário, tal como formação de fibrina. A AGP mostrou inibir, através de dose-efeito, a agregação plaquetária induzida pela ADP ou pela epinefrina. As concentrações necessárias de AGP para se obter este efeito são um pouco elevadas (1,25-7,5 mg/mL). Acredita-se então que a AGP regula negativamente o contínuo recrutamento de plaquetas. Esta função é partilhada com os leucócitos, que possuem um contacto íntimo com as plaquetas e exercem uma função anti-trombótica ao inibirem a contínua ativação e recrutamento plaquetário. Assim, compreende-se que a produção local de AGP pelos leucócitos se pode tratar de um dos mecanismos pelos quais os leucócitos exercem a sua função anti-trombótica (Hochepped el al., 2003).

Outros efeitos da AGP incluem a estimulação da proliferação de fibroblastos, a regeneração nervosa e interação com o colagénio, efeitos importantes na cicatrização. Os estudos *in vitro* mostraram tanto efeitos pro-inflamatórios como anti-inflamatórios da AGP.

Estes efeitos imunomodulatórios duplos podem indicar que a AGP possui um importante papel tanto na regulação da resposta imune como da inflamação (Hochepped, et al., 2003).

Nos estudos *in vivo*, a AGP mostrou-se capaz de proteger o murganho contra o choque induzido pela TNF (Hochepped et al., 2000; Fournier, 2000). Esta proteção observada, tanto em modelos de choque séptico bacteriano ou de peritonite séptica, deve-se possivelmente à formação de uma barreira capilar aumentada, evitando extravasamento capilar e mantendo a perfusão para os órgãos vitais (Hochepped et al., 2003).

e. Doseamento da AGP

As proteínas séricas são compostas por diversas proteínas, com fracionamento eletroforético, característica útil para diagnóstico, permitindo-nos estudar as alterações que certas doenças provocam às proteínas séricas. Sem dúvida que a abordagem mais correta seria monitorizar as alterações da maioria, se não, de todas as proteínas séricas, mas, até que a tecnologia avance suficientemente, o único significado para monitorização de proteínas séricas é o uso de métodos diretos que doseiam proteínas específicas. Ao longo dos anos o número de proteínas identificadas com valor de diagnóstico tem vindo a aumentar, consequentemente levando ao desenvolvimento de testes que permitem uma análise rotineira (Eckersall, 2008).

Quando escolhemos uma técnica para uma proteína sérica específica deve-se ter em consideração o intervalo das concentrações a analisar, o tempo para obter os resultados e a sua facilidade de execução. Estas técnicas baseiam-se na reacção antigénio-anticorpo permitindo fornecer dados qualitativos e quantitativos (Eckersall, 2008).

As técnicas mais utilizadas para o doseamento da AGP são a Radioimunodifusão (RID) (Mancini, Carbonara & Heremans, 1965), a Imunoturbidimetria (IT) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) (Bence, Addie & Eckersall, 2005).

A técnica de RID possui algumas desvantagens, pois trata-se de uma técnica demorada, levando 24 a 48h para se obterem resultados, e requerendo um operador qualificado para assegurar a reprodutibilidade e precisão dos resultados (Bence et al., 2005).

A IT é uma técnica cuja reacção requer apenas alguns minutos por isso é uma das técnicas de eleição para doseamento de proteínas cujas concentrações são superiores a 0,5 – 1,0 mg/dL. É bastante utilizada em medicina humana para a determinação de proteínas como a proteína C reativa, mas a dificuldade em encontrar reagentes adequados para medicina veterinária tem sido um dos entraves para o seu uso nesta área (Eckersall, 2008).

O ELISA faz uso de anticorpos ou de antigénios marcados enzimaticamente para que, quando combinados com o substrato, produzam uma alteração de cor detetável. A alteração de cor é normalmente medida com o uso de espectrofotómetro (Callahan & Yates, 2014), sendo a

intensidade da cor diretamente relacionada com a quantidade de antígeno presente. Esta técnica é muito utilizada na detecção do vírus da leucemia felina (Tizard, 2013a).

A monitorização da concentração sérica da AGP permite obter informações sobre a resposta imunitária inata do organismo. Atualmente, a AGP em gatos está a tornasse num dos parâmetros laboratoriais importantes na obtenção de informação para diagnóstico, monitorização e avaliação da resposta às terapêuticas instituídas no caso de PIF e de doenças neoplásicas. Alguns autores afirmam que a aplicabilidade no doseamento da AGP em gatos é mesmo a sua utilidade na diferenciação entre PIF efusivo e outras condições semelhantes, como sejam cardiomiopatia, neoplasia e doença hepática. Na cardiomiopatia, a concentração sérica de AGP é normalmente menor que 0,5 g/L, já em casos de neoplasia estes valores estão ligeiramente aumentados. Na PIF, a concentração de AGP no soro e no líquido peritoneal está usualmente igual ou superior a 1,5 g/L, havendo tendência para estar mais aumentada na PIF efusiva do que na não-efusiva (Bence et al., 2005).

Existe um estudo em gatos com linfoma em que se observou um aumento da concentração da AGP, quando comparado com gatos saudáveis. Porém, a recorrência da doença não foi precedida por um aumento sérico da mesma (Correa et al., 1998).

Embora exista diferença entre espécies nas concentrações de AGP durante o período neonatal, a sua concentração não parece ser influenciada pela idade (Selting et al., 2000).

Tabela 6 – Doseamento da AGP em gatos saudáveis não livres de patógenos específicos.

Autores	Concentração de AGP em gatos controlo usando o método RID
Giordano et al. (2004)	1,20±0,62 g/L
Selting et al. (2000)	0,12 g/L – 0,88 g/L
Winkel et al. (2015)	0,26 g/L – 0,58 g/L

As variações séricas da AGP ainda não se encontram bem estabelecidas, contudo, existem vários autores a afirmar que a AGP atinge valores iguais ou superiores a 5 g/L em gatos doentes (Kajikawa et al., 1999; Paltrinieri et al., 2007b; Shida et al., 2012; Selting et al., 2000).

Um estudo realizado em gatas saudáveis sujeitas a ovariectomia concluiu que a concentração de AGP atingiu um pico 8 horas após a cirurgia, mantendo-se elevado durante os 4 dias seguintes (Tamamoto et al., 2008). Noutro estudo, desta vez com gatos sujeitos a uretostomia, o pico da concentração da AGP aconteceu ao terceiro dia pós-cirúrgico (Kajikawa et al., 1999).

PARTE III - VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO NA GENGIOESTOMATITE CRÓNICA FELINA

1. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Introdução

A gengivoestomatite crónica é uma síndrome inflamatória multifactorial (Healey et al., 2007) com diversos agentes etiológicos, o que dificulta o estabelecimento de protocolos terapêuticos eficazes. Atualmente o tratamento recomendado é cirúrgico, existindo uma melhoria significativa ou mesmo cura em dois terços dos casos. Os restantes, que geralmente apresentam lesões de mucosite caudal, não respondem totalmente a este tratamento, havendo ainda um subgrupo, 6,3% dos animais que persistem sem qualquer resposta à intervenção cirúrgica (Jennings et al., 2015).

Biomarcadores inflamatórios tais como a AGP constituem uma ferramenta valiosa no acompanhamento da evolução de uma doença inflamatória em resposta à terapêutica instituída (Bence et al., 2005). Neste contexto, a AGP, à semelhança da SAA, é uma proteína de fase aguda utilizada na monitorização de doenças inflamatórias no gato (Winkel et al., 2015; Paltrinieri et al., 2007; Kajikawa et al., 1999).

Assim, formulou-se a hipótese que a AGP poderá ser um biomarcador na monitorização da resposta terapêutica ao tratamento cirúrgico da GEFCF.

b. Objetivos

O estudo teve como objetivos:

- Determinar os níveis de AGP numa amostra de gatos com diagnóstico de GEFCF.
- Comparar os níveis de AGP dos animais doentes, grupo doentes (E), com o grupo controlo (C).
- Determinar a evolução da AGP no mesmo grupo de animais em dois momentos após extrações dentárias: 30 dias e 60 dias.

c. Amostra

Foram incluídos um total de 20 animais no estudo: 10 doentes e 10 controlos. A amostra de animais doentes resultou da consulta em três Centros de Atendimento Médico-Veterinários de Lisboa e no HEV, durante o período compreendido entre 4 de setembro de 2017 e 14 de março de 2018. A amostra de animais que constitui o grupo de controlo resultou da consulta no

HEV durante o mesmo período.

A realização deste estudo teve a autorização da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lisboa (Anexo I). Todos os tutores assinaram um consentimento informado autorizando a participação do seu animal no estudo.

d. Critérios de seleção

Grupo controlo: foram incluídos todos os gatos que não revelaram sinais de gengivite, gengivoestomatite, doença periodontal ou doença sistémica, até aos dois anos de idade. Assim foram incluídos gatos com análises pré-cirúrgicas (hemograma e bioquímicas básicas – proteínas totais, albumina, ureia e creatinina – sem alterações e análise de anticorpos FIV e antigénio para FeLV, negativos) realizadas na sequência de avaliação pré-cirúrgica para cirurgia eletiva.

Grupo doentes: foram incluídos gatos com gengivostomatite crónica, com idade superior a dois anos e sem co-morbilidades aparentes pelo exame objetivo e análises sanguíneas – as mesmas já descritas para o grupo de controlo.

e. Critérios de exclusão

Os gatos que apresentavam alterações hematológicas compatíveis com doença sistémica, como por exemplo, neoplasia, doença renal ou hepática, entre outras, foram excluídos do estudo. Procedeu-se também à exclusão de animais positivos aos retrovírus, FIV ou FeLV, animais recentemente vacinados (com menos de 15 dias entre a vacinação e o dia da primeira colheita) e os medicados com fármacos imunossupressores.

Excluíram-se ainda todos os gatos que desenvolvessem alterações sistémicas no decorrer do estudo.

f. Procedimentos

i. Questionário aos tutores

Previamente à admissão do animal para o procedimento cirúrgico foi preenchido um inquérito por parte tutores dos animais. Este incidiu-se sobre a alimentação do animal, a higiene diária do mesmo, a atividade física e a perceção do tutor sobre o nível de conforto do seu animal. Os tutores foram igualmente questionados sobre o protocolo vacinal dos seus animais, o modo de vida (se tinham acesso ao exterior ou viviam exclusivamente dentro de casa), os sinais

clínicos dos animais e início dos mesmos (Anexo 2).

ii. Procedimento anestésico

Os gatos em estudo foram pré-medicados com dexmedetomidina (0,05 mg/Kg, IM), quetamina (5 mg/Kg, IM), metadona (0,5 mg/Kg, IM) e utilizou-se propofol (1 mg/Kg, IV) para indução anestésica, mantendo a anestesia com isoflurano (1,2% concentração alveolar mínima) misturado em oxigénio (100%) através de circuito semi-aberto. Realizou-se fluidoterapia intravenosa com cloreto de sódio isotónico (NaCl a 0,9%) na dose de manutenção cirúrgica (10 ml/Kg/h).

iii. Exame estomatológico-dentário

Todos os gatos foram submetidos a um exame estomatológico-dentário aquando da recolha de sangue para doseamento da AGP. Este exame foi realizado sob sedação ou anestesia geral, antes de qualquer procedimento invasivo, no dia da intervenção.

Utilizou-se um sistema de avaliação das lesões, com classificação da estomatite e da mucosite caudal em 5 graus, dividindo a cavidade oral em quatro quadrantes (maxila esquerda, maxila direita, mandíbula esquerda e mandíbula direita). O grau 0 representava ausência de lesão; o grau 1 inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangrante espontaneamente, não sangrante quando aplicada ligeira pressão; o grau 2 inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangrante espontaneamente, não sangrante quando aplicada ligeira pressão; o grau 3 inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangrante espontaneamente, mas sangrante quando aplicada uma ligeira pressão, e finalmente, o grau 4 inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangrante espontaneamente. Por fim, a área total de lesão foi classificada em 7 graus, sendo o grau 0: ausência de lesão, grau 1 área total de lesão de 0 até 0,5 cm², grau 2 área total de 0,5 até 1 cm², grau 3 área total de 1 até 2 cm², grau 4 área total de 2 até 3 cm², grau 5 área total de 3 até 4 cm² e grau 6 área total > 4 cm² (Anexo 3).

iv. Radiografias dentárias

Foram realizadas radiografias intraorais, antes e após tratamento, utilizando técnicas paralelas para a aquisição de imagens de molares e pré-molares mandibulares e técnicas de bissetriz para os restantes dentes.

v. Outros exames complementares de diagnóstico

De forma a caracterizar a doença, foi realizada zaragatoa oral para pesquisa de Calicivírus (reação em cadeia da polimerase [PCR]) em tempo real no Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, tendo também sido colhida uma biópsia gengival para confirmação do diagnóstico e classificação de gravidade de acordo com escala de Harley, Gruffydd-Jones & Day (2011) (Tabela 7).

Tabela 7 – Sistema de classificação para as alterações histopatológicas. Segundo Harley et al. (2011).

	Classificação
	<p>Grau 0 – Normal Epitélio estratificado pavimentoso com escassos linfócitos intraepiteliais. A lâmina própria/submucosa contém escassos mastócitos e linfócitos. Os linfócitos podem formar pequenos agregados subepiteliais.</p>
	<p>Grau 1 – Inflamação Ligeira Hiperplasia epitelial ligeira e paraqueratose. Pode existir um ligeiro aumento do número de linfócitos intraepiteliais e raros neutrófilos em exocitose. A lâmina própria/submucosa contém escassas populações de plasmócitos, linfócitos, mastócitos e raros macrófagos, perivascularares ou intersticiais.</p>
	<p>Grau 2 – Inflamação Moderada Hiperplasia epitelial variável com regiões de degeneração ou ulceração. O número de linfócitos intraepiteliais é ligeiro a moderado, variavelmente misturados com macrófagos e neutrófilos. A lâmina própria/submucosa contém um moderado número de infiltrado celular inflamatório, com linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. As células inflamatórias podem formar uma banda distinta “liquenoide” na superfície da lâmina própria. Na submucosa os infiltrados celulares estendem-se frequentemente ao longo das fibras do músculo esquelético.</p>
	<p>Grau 3 – Inflamação Grave Existência de muitas regiões com degeneração epitelial, ulceração e exsudação superficial com muitos macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A lâmina própria/submucosa contém um denso infiltrado inflamatório com porções variáveis de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. Nalgumas secções a lâmina própria está estendida ou substituída por tecido granuloso imaturo e detritos fibronecróticos.</p>

vi. Tratamento Dentário

Após intubação, registo de lesões e realização das radiografias dentárias, a cavidade oral foi lavada com clorexidina a 0,2%. Com base nos achados clínicos e radiográficos, foram realizados bloqueios nervosos antes da realização das extrações, com o uso de lidocaína na dose de 1 mg/kg, garantindo-se uma analgesia local. Nos animais sujeitos a extrações dentárias realizou-se antibioterapia intra-cirúrgica com Cefazolina (22 mg/kg, IV) ou associação de Amoxicilina com Ácido Clavulânico (15 mg/kg, SC), e anti-inflamatório não esteroide, como Meloxicam (0,05-1 mg/kg, SC).

Procedeu-se ao tratamento cirúrgico que consistiu na remoção do cálculo dentário e polimento dos dentes, seguido de extrações de todos os dentes que apresentassem lesões clínicas, radiográficas ou localizados junto a áreas intensamente inflamadas. As extrações foram realizadas recorrendo a técnicas cirúrgicas de retalho, odontosecção de dentes multiradiculados, alveolotomia e encerramento com suturas simples interrompidas, de fio reabsorvível monofilamentoso 5/0.

Foi prescrito para os dias seguintes: antibioterapia, analgesia, anti-inflamatório não esteroide e gel desinfetante/cicatrizante.

g. Recolha de amostras sanguíneas para doseamento de AGP

Em todos os animais, foram realizadas colheitas de sangue periférico, de forma asséptica em tudo seco para o doseamento da alfa-1 glicoproteína ácida.

A partir do sangue total, após centrifugação a 7000 rpm durante 5 minutos, colheu-se o soro, tendo o mesmo sido congelado a -20°C até posterior processamento.

Nos animais do grupo controlo foi realizada apenas uma colheita sanguínea e nos animais do grupo com gengivostomatite, foram realizadas três colheitas: antes do procedimento, aos 30 dias e aos 60 dias após o tratamento anteriormente descrito.

h. Classificação de resposta ao tratamento

A classificação de resposta ao tratamento compreendeu a atribuição de um parâmetro numérico denominado eficácia do tratamento (EDT) para caracterizar a resposta de cada gato ao tratamento cirúrgico. Esta escala teve por base estudos anteriores (Lommer, 2013).

- Grau EDT 0 (zero): gatos sem evolução favorável ou que pioram clinicamente após a extração total ou parcial.

- Grau EDT 1 (um): gatos que apresentem uma ligeira melhoria após as extrações parciais ou totais, com permanência de alguns sinais clínicos.
- Grau EDT 2 (dois): gatos com melhoria significativa (sem sinais clínicos aparentes) após as extrações parciais ou totais.
- Grau EDT 3 (três): atribuído a animais que apresentem resolução completa após as extrações parciais ou totais – cura clínica (Oliveira, 2017).

Neste trabalho a classificação foi realizada com base nas reavaliações clínicas aos 30 e 60 dias (ANEXO IV). Estas classificações foram ainda agrupadas em insucesso ou sucesso correspondendo ao agrupamento das classificações 0 e 1 ou 2 e 3, respetivamente.

i. Doseamento da alfa-1 glicoproteína ácida

Neste ensaio foi utilizado um *kit* de ELISA disponível no mercado (Life Diagnostics, Inc.). Este *kit* apresenta na sua constituição anticorpos purificados de AGP felina na fase sólida imóvel e anticorpos de AGP felinos conjugados com peroxidase de rábano como anticorpo de deteção. Na presença de moléculas de AGP ligadas à fase imóvel e por reação com os anticorpos de deteção, o poço desenvolve a cor azul. O desenvolvimento da cor termina na sequência da adição de uma solução de paragem, alterando a cor para amarelo. De seguida, é medida a absorvância a 450 nm (A450), no espectrofotómetro. A concentração da AGP é proporcional à absorvância determinada e calculada através de uma curva pré-elaborada (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores exemplo, cedidos pelo fornecedor do kit, para construção de uma curva padrão.

AGP (ng/ml)	Absorvância (450 nm)
50	2,94
25	1,74
12,5	0,99
6,25	0,54
3,13	0,38

O fornecedor apresenta, na instrução do *kit*, os valores médios de AGP, doseados em cinco gatos saudáveis de pêlo curto americano. De acordo com as recomendações do fabricante, as amostras foram diluídas e as suas concentrações foram determinadas através da sua absorvância a 450 nm e posteriormente convertidas em ng/ml. As concentrações séricas em µg/ml foram depois calculadas multiplicando as concentrações das amostras pelo seu respetivo fator de diluição. Os valores médios, o desvio padrão (σ) e o coeficiente de variação (CV) foram então calculados (Tabela 9).

Tabela 4 – Valores fornecidos nas instruções do kit ELISA, obtidos em cinco gatos saudáveis

Amostra	Diluição	A450	ng/ml	µg/ml	Média µg/ml	σ (µg/ml)	CV
1	4000	1,64	31,51	126,1	137,5	10,4	7,5
	8000	0,90	16,51	132,1			
	16000	0,53	8,90	142,4			
	32000	0,32	4,67	149,3			
2	4000	2,09	40,65	40,65	160,7	8,6	5,4
	8000	1,02	18,87	18,87			
	16000	0,57	9,86	9,86			
	32000	0,35	5,36	5,36			
3	4000	1,93	37,50	150,0	139,7	12,0	8,6
	8000	0,85	15,49	124,0			
	16000	0,51	8,55	136,8			
	32000	0,32	4,62	148,0			
4	4000	1,95	37,91	151,6	147,7	5,9	4,0
	8000	0,96	17,81	142,5			
	16000	0,53	8,92	142,7			
	32000	0,33	4,81	153,8			
5	4000	3,42	67,83	271,3	276,2	18,6	6,7
	8000	1,95	37,88	303,1			
	16000	0,92	16,90	270,4			
	32000	0,49	8,13	260,0			

Absorvância 450 nm (A450), concentrações das amostras diluídas (ng/ml), concentração sérica de AGP (µg/ml), média (µg/ml), σ e Coeficiente de Variação (CV).

j. Análise estatística

Os resultados foram registados numa folha de cálculo de Microsoft® Excel® 2016, programa que foi utilizado para o cálculo da estatística descritiva e para a realização dos gráficos circulares e de barras.

Para a realização da estatística inferencial foi utilizado o software R (3.5.0, © The R Foundation). Para a comparação das variáveis contínuas (quantificação de AGP e comparação entre os grupos) foi utilizado o teste t e o teste Spearman's rank. Para a comparação de variáveis ordinais e nominais foram utilizados testes não paramétricos Wilcoxon rank sum. Consideram-se as diferenças entre grupos como estatisticamente significativas, quando o valor p (nível de significância) foi inferior a 0.05, para um intervalo de confiança (IC) de 95%.

2. RESULTADOS

a. Caracterização da amostra

A caracterização da amostra dos grupos doentes e controlos encontra-se resumido na Tabela 10, tendo sido incluídos 10 animais em cada grupo. De entre os 20 gatos estudados, 8

eram machos (40%) e 12 eram fêmeas (60%), com um peso vivo médio de 3,64kg (3,38kg no grupo de controlo e 3,90kg do grupo doentes), 3,5 anos de idade média (7,3 meses de idade no grupo de controlo e 7,3 anos de idade no grupo doentes). No grupo controlo, os gatos incluídos eram todos jovens, não existindo nenhum animal com idade superior a 12 meses. A maioria dos gatos de controlo (7/10) apresentava idade entre os 6 e os 7 meses. Nos anexos V e VI encontram-se os dados completos da caracterização da amostra.

Tabela 5 - Descrição dos grupos controlo e estudo (SRD – sem raça definida; M – macho; F – fêmea).

Gato	Raça	Sexo	Idade (meses)	Peso (kg)
Grupo controlo				
1C	SRD	F	7	3,00
2C	SRD	M	6	4,00
3C	SRD	F	7	2,60
4C	SRD	F	6	3,15
5C	SRD	M	12	3,80
6C	SRD	F	6	2,95
7C	SRD	F	8	3,50
8C	SRD	F	6	3,65
9C	SRD	F	7	2,95
10C	SRD	M	8	4,20
Grupo estudo				
			Idade (anos)	
1E	SRD	F	13	2,89
2E	SRD	F	13	3,50
3E	SRD	M	4	5,00
4E	SRD	M	3	5,00
5E	SRD	F	11	4,20
6E	SRD	M	2	4,73
7E	SRD	M	9	3,35
8E	SRD	F	5	2,50
9E	SRD	F	4	4,70
10E	SRD	M	9	3,20

b. Sinais clínicos

Em relação à cronicidade dos sinais clínicos, 90% dos animais apresentavam a doença há mais de 6 meses, existindo apenas um animal com o diagnóstico há 4 meses.

Os sinais clínicos relatados através do tutor encontram-se resumidos no Anexo VII (questionário realizado Anexo IV), onde se realça que, antes do tratamento cirúrgico, apenas 2/10 dos animais apresentava apetite normal e 1/10 estava confortável na consideração do tutor. No que diz respeito à avaliação das lesões, os graus de estomatite e mucosite caudal, obtidos nos quatro quadrantes, assim como a área das lesões encontram-se resumidas na Tabela 11.

c. Radiografias dentárias intra-orais

Nas radiografias dentárias intra-orais realizadas no grupo doentes verificou-se que 8/10 gatos apresentavam lesões de RD, sendo que apenas os gatos 6E e 10E não apresentavam este achado radiológico.

d. PCR de calicivírus

Todos os animais do grupo doentes obtiveram resultado positivo na PCR para calicivírus.

e. Histopatologia

Quanto à análise histopatológica realizada, todos os animais exibiram exuberante e intensa infiltração do córion da mucosa gengival por plasmócitos e linfócitos, sendo que 50% dos animais apresentavam também infiltração por neutrófilos. Foram frequentemente detetadas células de Mott, plasmócitos (linfócitos B) com inclusão de imunoglobulinas (Ig), também chamados de corpúsculos de Russell (Dolieslager, 2012). Segundo a classificação de Harley et al., 2011, todas as lâminas (10/10) foram classificadas com a gravidade máxima de inflamação (grau 3).

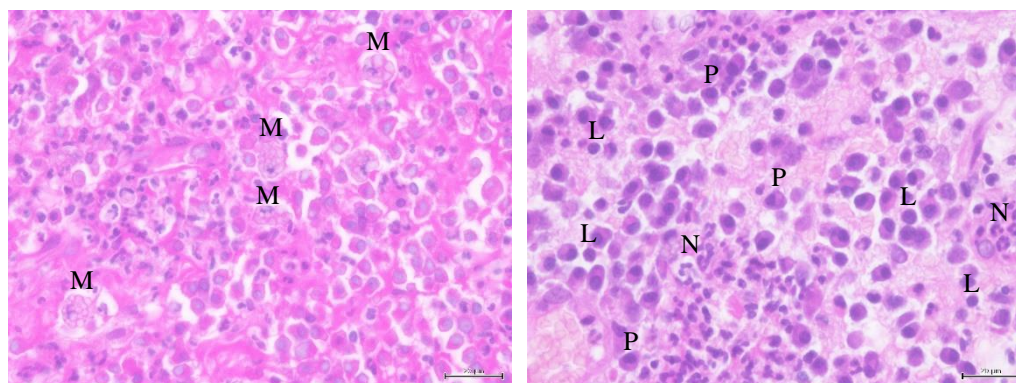


Figura 13 – Fotomicrografias (ampliação 100x) da mucosa oral, coradas com hematoxilina e eosina (H&E) (barra 20µm), de gatos com GECF (grupo casos), grau 3 segundo a escala de Harley et al., 2011. À esquerda, presença regular e intensa de células de Mott (M). À direita, a lâmina própria/submucosa contém um denso infiltrado inflamatório com proporções variáveis de linfócitos (L), plasmócitos (P) e neutrófilos (N).

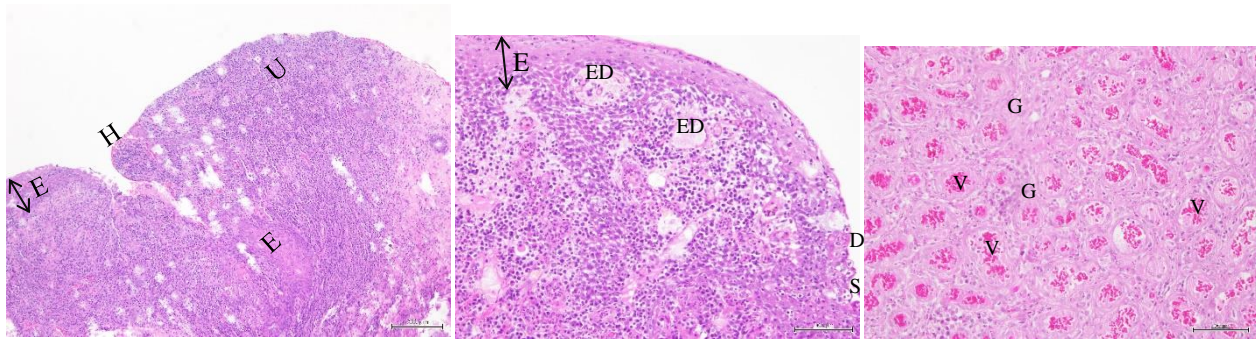


Figura 14 – Fotomicrografias da mucosa oral, coradas com H&E, de gatos com GEFC (grupo casos), grau 3 segundo a escala de Harley et al., 2011. À esquerda (ampliação de 10x) (barra 200µm), extensa área com ulceração (U) existindo apenas uma zona com epitélio normal (E). Presença de exsudação superficial com células inflamatórias e hemorragia (H). Ao centro (ampliação 20x) (barra 100µm), observam-se regiões com degeneração epitelial (D), espongiose (S) e edema (ED). À direita (ampliação 20x) (barra 100µm), realça-se a substituição de algumas zonas da lâmina própria por tecido de granulação (G), sendo notório o elevado número de neovasos (V).

f. Resposta ao tratamento

A resposta ao tratamento instituído no grupo de 10 animais doentes encontra-se resumida na Tabela 11 e Gráfico 1. Existe uma diminuição dos graus estudados nos dias 0, 30 e 60, sendo que apenas as médias das áreas de lesões entre o dia 0 e o dia 60 obtiveram resultado estatisticamente significativo ($p=0.039$). Também pela análise do ANEXO VII, é de realçar que após o tratamento cirúrgico, existiu uma melhoria dos sinais clínicos avaliados.

Metade dos animais de estudo (5/10) responderam favoravelmente ao tratamento cirúrgico, co-adjuvado com tratamento médico de suporte nos 5 dias pós-cirúrgico, sendo que 60% desses (3/10) atingiram a cura clínica (Tabela 12).

Tabela 6 - Média dos 4 quadrantes das áreas totais de lesões, dos graus de estomatite e de mucosite caudal aos 0, 30 e 60 dias.

		Gato	Dias			Valor p
			0	30	60	
Graus	Mucosite Caudal	1E	3,5	3,5	3,5	0,05
		2E	1,5	1	0,5	
		3E	3	3	3	
		4E	3,5	2,5	1,5	
		5E	3	3	3	
		6E	3,5	2	2	
		7E	4	3	3	
		8E	4	3,5	3	
		9E	3	3	3	
		10E	3	3	3	
	Estomatite	1E	2	1,5	1,5	0,349
		2E	0,5	0,5	0	
		3E	3	3,5	3,5	
		4E	3	2	1	
		5E	1,5	2	2	
		6E	3,75	3	3	
		7E	3,5	2,5	2,5	
		8E	4	2	2	
		9E	1	1,5	1,5	
		10E	3,5	3	3	
	Área Total das lesões	1E	5	4	4	0,039
		2E	5	4	2	
		3E	6	6	6	
		4E	6	5	3	
		5E	6	6	6	
		6E	6	6	5	
		7E	6	5	5	
		8E	6	6	5	
		9E	5	5	5	
		10E	6	6	6	

Comparou-se as médias dos graus estudados entre o dia 0 e o dia 60. Pelo valor p encontrado ($p < 0.05$) existe uma diferença estatisticamente significativa entre o dia 0 e o dia 60, das médias das áreas totais de lesão.

Gráfico 1 - Evolução das médias dos graus: das áreas totais das lesões, da estomatite e mucosite caudal aos 0, 30 e 60 dias.

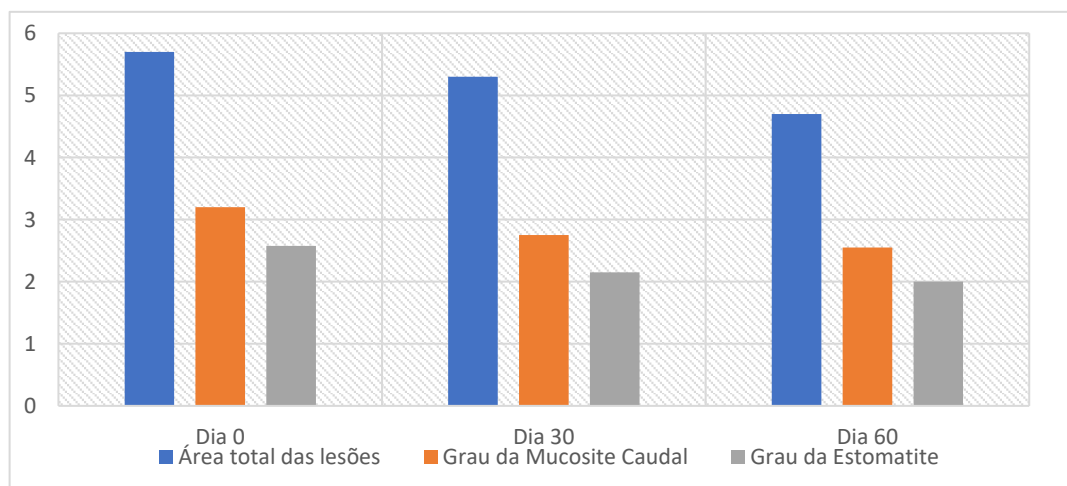


Tabela 7 – Classificação de resposta ao tratamento cirúrgico.

Gato	EDT	Classificação
1E	0	Insucesso
2E	3	Sucesso
3E	2	Sucesso
4E	3	Sucesso
5E	1	Insucesso
6E	3	Sucesso
7E	1	Insucesso
8E	2	Sucesso
9E	1	Insucesso
10E	0	Insucesso

g. Resultados do doseamento da AGP

A média de valores de AGP dos gatos controlo foi de 0,28 mg/mL (valores individuais na Tabela 13). O caso 1C foi excluído da média por apresentar duas leituras de absorvância díspares.

Tabela 8 - Concentração de AGP obtida nos gatos do grupo controlo.

Gato	AGP (mg/mL)
1C*	0,44
2C	0,20
3C	0,22
4C	0,33
5C	0,26
6C	0,12
7C	0,12
8C	0,30
9C	0,38
10C	>0,61

*O controlo 1C apresentava valores de absorvância muito díspares pelo que foi censurado.

A média de valores de AGP dos gatos do grupo doentes aos dias 0, 30 e 60 foi de 0,44 mg/mL, 0,43 mg/mL, 0,41 mg/mL, respetivamente (valores individuais na Tabela 14). O caso 6E foi removido da média por apresentar duas absorvâncias díspares nas amostras duplicadas.

Tabela 9 – Concentração de AGP obtida nos gatos do grupo com doença (pré e pós-tratamento).

Gato	AGP (mg/mL)			Variação T1 (%)		Variação T2 (%)		Variação T3 (%)	
	D0 (mg/mL)	D30 (mg/mL)	D60 (mg/mL)	Dim.	Aum.	Dim.	Aum.	Dim.	Aum.
1E	>0,61	>0,61	>0,61	0	0%	0%	0%	0%	0%
2E	0,29	0,27	0,24	8,8%		9,3%		17,34%	
3E	0,34	>0,61	0,44		81%	28,9%			28,7%
4E	>0,61	0,34	0,27	44,1%		20,2%		55,6%	
5E	0,23	0,25	0,33		9,4%		28,6%		40,8%
6E*	0,08	0,35	0,43		364%		20,7%		447,4%
7E	>0,61	>0,61	>0,61	0%	0%	0%	0%	0%	0%
8E	0,46	0,24	0,19	50,2%		20,3%		55,1%	
9E	0,50	>0,61	>0,61		21,7%	0%	0%		21,7%
10E	0,33	0,31	0,35	6,4%			14,1%		6,7%

T1: Entre D0 e D30; T2: Entre D30 e D60; T3: Entre D0 e D60. Dim.: Diminuição; Aum.: Aumento. *Eliminado o 6E por se tratar de um ponto discrepante, tendo valores de absorvância no D30 muito díspares, ilustrando uma média irreal para comparação.

Pela análise da Tabela 14 realça-se que apenas 3/10 dos animais têm uma diminuição da concentração de AGP entre o dia 0 e o dia 60 (T3). No entanto esta descida não foi estatisticamente significativa ($p=0,69$).

Tabela 10 – Relação da presença de RD com AGP no dia 0.

Gato	RD	AGP (mg/mL) D0
1E	Presentes	>0,61
2E	Presentes	0,29
3E	Presentes	0,34
4E	Presentes	>0,61
5E	Presentes	0,23
6E	Ausentes	0,08
7E	Presentes	>0,61
8E	Presentes	0,46
9E	Presentes	0,50
10E	Ausentes	0,32

Na Tabela 15 compara-se a concentração sérica da AGP com a presença/ausência de lesões de RD nos animais do grupo doentes.

Já na Tabela 16 resume a média de valores de AGP por tipo de lesão encontrada. Por análise do gráfico 2 verificou-se que os animais com graus de mucosite caudal, previamente ao tratamento, apresentavam valores mais elevados de AGP, estatisticamente significativos ($p=0,03$).

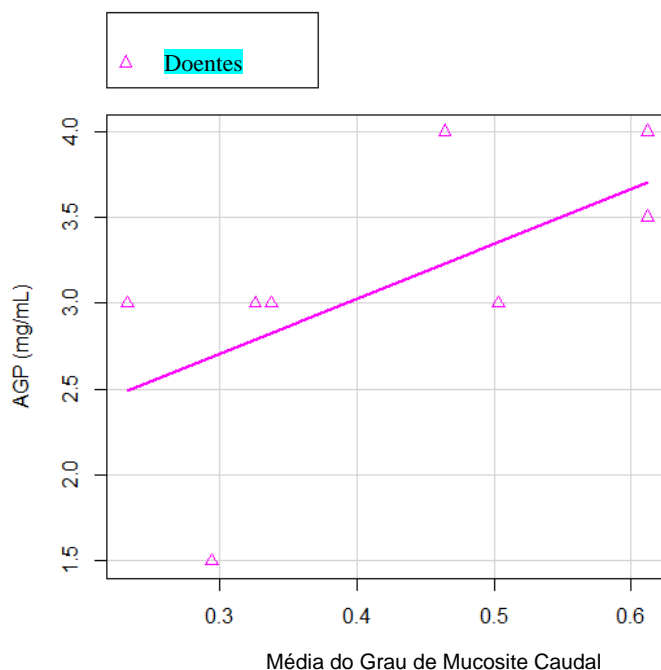
Tabela 11 – Correlação entre a média da concentração de AGP nos diferentes períodos estudados e a média do grau das lesões encontradas.

	AGP (mg/mL)	Mucosite caudal	Estomatite	Média Grau Área total de lesões
D0	Média: 0,44 (σ : 0,15)	Média: 3,17 (σ : 0,75) $\rho=0,72$; $p=0,03$	Média: 2,44 (σ : 1,23) $\rho=0,30$; $p=0,43$	Média: 5,67 (σ : 0,5) $\rho= -0,09$; $p=0,81$
D30	Média: 0,429 (σ : 0,1763)	Média: 2,83 (σ : 0,75) $\rho=0,05$; $p=0,89$	Média: 2,06 (σ : 0,88) $\rho=0,72$; $p=0,03$	Média: 5,22 (σ : 0,83) $\rho= -0,38$; $p=0,31$
D60	Média: 0,406 (σ : 0,1688)	Média: 2,61 (σ : 0,96) $\rho=0,62$; $p=0,07$	Média: 1,89 (σ : 1,05) $\rho=0,724$; $p=0,03$	Média: 4,67 (σ : 1,41) $\rho=0,28$; $p=0,46$

ρ - Coeficiente de correlação.

Também animais com graus de estomatite mais elevados no pós-cirúrgico, apresentavam, nessa mesma reavaliação, valores de AGP significativamente superiores ($p=0,0275$).

Gráfico 2 - Relação entre a média do grau de mucosite caudal no dia 0 com a concentração de AGP (mg/mL).
 $p= 0,03$.

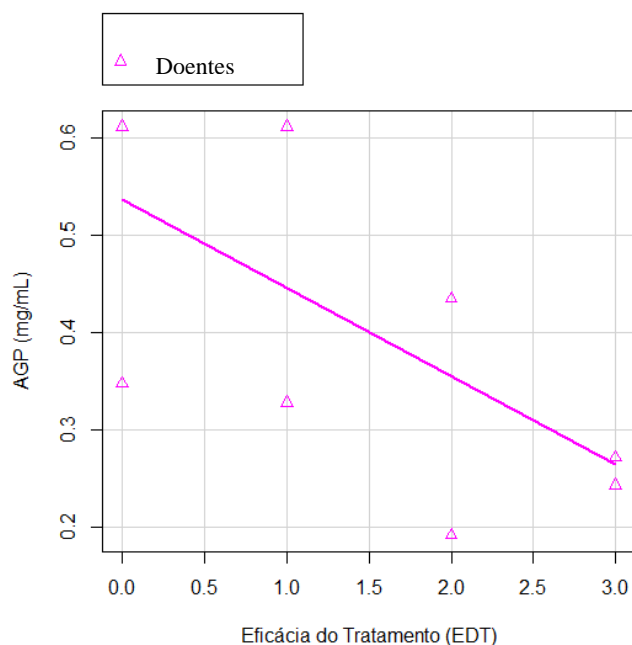


A Tabela 17 correlaciona os valores do sucesso terapêutico (EDT) com as concentrações médias de AGP doseadas no primeiro e últimos tempos estudados. Observou-se uma relação direta entre a EDT e o nível de AGP ao dia 60, próximo do estatisticamente significativo ($p=0,055$). No entanto, não se observou uma relação significativa entre a EDT e o dia 0 ($p=0,83$).

Tabela 12 – Relação entre a EDT com a concentração de AGP no primeiro e último tempo estudado.

Gato	EDT	Dia 0		Dia 60	
		Média AGP (mg/mL)	Valor-p	Média AGP (mg/mL)	Valor-p
1E	0	0,44	0,83	0,41	0,055
2E	3				
3E	2				
4E	3				
5E	1				
7E	1				
8E	2				
9E	1				
10E	0				

Gráfico 3 – Relação entre o nível de AGP (mg/mL) no dia 60 com o grau de EDT. $p=0,055$.



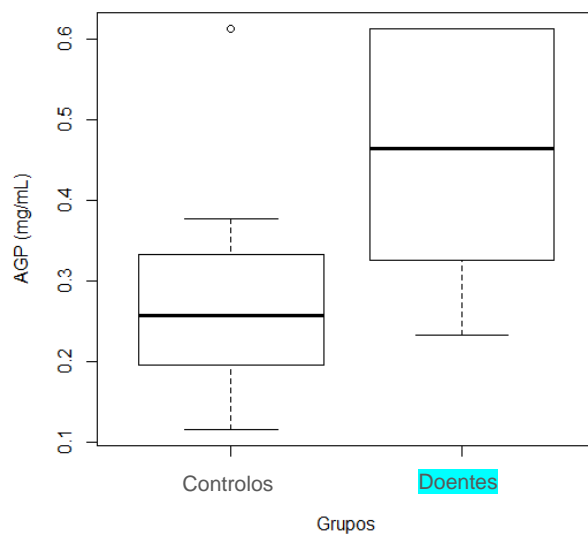
h. Comparação de grupos

A Tabela 18 e o Gráfico 4 a comparam os níveis de AGP entre o grupo controle e o grupo doentes. Foram encontradas diferenças significativamente estatísticas ($p=0,04$) entre o grupo controle ($0,28\pm 0,15$ mg/mL, IC 95%) e o grupo de estudo ($0,44\pm 0,15$ mg/mL, IC 95%).

Tabela 13 – Resultados da análise estatística inferencial dos níveis de AGP nos dois grupos de estudo (grupo controle e grupo doentes).

		AGP	
		Grupo Controle	Grupo Doentes
Média		0,28	0,44
95% IC para a média	Limite Inferior	0,16	0,33
	Limite Superior	0,40	0,56
σ		0,15	0,15
Valor mínimo		0,12	0,19
Valor máximo		0,61	0,61

Gráfico 4 – Representação dos resultados da concentração da AGP felina nos grupos estudados (grupo controlo e grupo doentes no dia 0).



No grupo de controlo observou-se um ponto inapropriado, com concentração da proteína bastante elevada.

3. DISCUSSÃO

Este trabalho procurou testar a hipótese de a GECE estar associada a um estado crónico de inflamação sistémica, bem como a utilidade do doseamento da AGP na monitorização da resposta terapêutica. Nesse sentido, foram realizados doseamentos de AGP em gatos doentes e em gatos saudáveis, estes últimos utilizados como controlo. O desenho do estudo foi do tipo caso-controlo prospetivo, de forma a melhor determinar o efeito provocado pelo tratamento, eliminando a influência de outras doenças que poderiam alterar os resultados, nomeadamente a presença de outras co-morbilidades (neoplasias, doenças inflamatórias crónicas, doenças endócrinas como diabetes e hipertiroidismo, e doenças infecciosas, nomeadamente FIV e FeLV). No grupo de controlo todos os gatos incluídos apresentavam idade inferior a 12 meses. A maioria dos gatos de controlo (7/10) apresentava idade entre os 6 e os 7 meses. Esta escolha pretendeu selecionar gatos com menor probabilidade de apresentarem co-morbilidades.

No grupo de gatos doentes foi efetuada a pesquisa de antigénio para calicivírus, uma vez que este vírus se encontra relacionado com a etiopatogenia da doença. No entanto, esta pesquisa não foi efetuada no grupo controlo por razões do foro económico. O autor reconhece que a pesquisa deste antigénio no grupo controlo poderia ter sido importante, para garantir a ausência de infeção neste grupo. A vacinação para o calicivírus felino está disponível há mais de 40 anos (Radford et al., 2009), parecendo existir uma tendência para a utilização de vacinas vivas atenuadas em Portugal. Adicionalmente, a prevalência do vírus na população felina é muito alta (Binns et al., 2000; Mochizuki et al., 2000; Gaskell, Radford & Dawson, 2004; MacLachlan & Dubovi, 2017), sendo um vírus altamente contagioso (Radford et al., 2009). Está descrito que a prevalência em gatos saudáveis varia entre os 15% e os 25% (Ellis, 1981; Harbour et al., 1991; Coutts et al., 1994). Porém, diferentes prevalências foram estudadas em outros países, nomeadamente na Suíça, em que a prevalência é de 2,6% (Holst, Berndtsson & Englund, 2005). Assim, dada a discrepância dos valores entre países e as prevalências poderem estar relacionadas com diferenças geográficas, poderá ser interessante a determinação da prevalência do CVF em gatos saudáveis em Portugal.

O CVF é um vírus implicado na etiopatogenia da GECE embora o seu papel não se encontre ainda esclarecido. A prevalência de CVF nos estudos é variável, entre 60% (Thomas et al., 2017; Fernandez et al., 2017) e valores superiores a 80% – 80%, segundo Lommer & Verstraete (2003) e 95,5%, segundo Dolieslager (2012). A prevalência registada neste estudo foi superior às anteriormente referidas, tendo sido identificado CVF por técnica de PCR, a partir de zaragatoa oral, em 100% dos gatos do grupo doentes. Estas diferenças podem estar relacionadas com a técnica de colheita da amostra uma vez que a zaragatoa tem de ser

friccionada nos tecidos orais até provocar alguma esfoliação, sendo por isso tecnicamente difícil recolher amostra suficiente a partir de gatos sem sedação/anestesia. Assim, é possível que nos estudos anteriores a recolha não tenha sido feita sob sedação e, por isso, não se tenha detetado a presença de CVF por insuficiente amostra recolhida. Os estudos de Thomas et al. (2017), Fernandez et al. (2017) e Lommer & Verstraete (2003) não referem em que condições foram colhidas as amostras. Já Dolieslager (2012) refere o cuidado na colheita das amostras para pesquisa de CVF, embora adianta que nem todos os animais foram sedados ou cooperaram durante o procedimento. Outra justificação possível está relacionada com a doença propriamente dita, devido à variabilidade da sua apresentação clínica. Neste estudo, o grupo de animais doentes possuía uma apresentação clínica muito homogénea, com lesões macroscópicas/histológicas graves, sendo a esfoliação mais facilitada.

A análise histológica das amostras de mucosa oral recolhidas revelou uma homogeneidade dos padrões histológicos, existindo extensas regiões de degeneração, espongirose, ulceração e exsudação superficial com linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. Em toda a peça, especialmente na lâmina própria/submucosa, era possível observar-se um abundante infiltrado de células inflamatórias, incluindo células de Mott. As células de Mott são plasmócitos com múltiplos vacúolos de imunoglobulinas. A presença destas células pode ter diversos significados, não estando eles completamente esclarecidos. Existem autores que referem que a sua presença resulta de uma estimulação imunológica crónica (Reginaldo et al., 2017), já Cotter (2015) refere que estas células de Mott são sentinelas citológicas para uma resposta imunológica aberrante.

Perante estes cenários é possível estabelecer algumas teorias. Existe um grande número de diferentes estirpes de CVF, que variam ligeiramente na sua antigenicidade e patogenicidade, mas com uma reação cruzada suficiente para possuírem o mesmo serotipo (Green, 2012). Por esta grande variabilidade de estirpes, com patogenicidades diferentes, puder-se-ia encontrar uma ou várias estirpes específicas, com maior afinidade para a mucosa oral, que pudesse justificar o desenvolvimento de GECE. À semelhança de outros vírus é possível que existam determinados biótipos do CVF que possam justificar as lesões crónicas de estomatite. Por exemplo, o Coronavírus Felino e o vírus da Peritonite Infeciosa Felina, ambos membros da família Coronaviridae, que são dois biótipos virais com diferente potencial patogénico (Duarte & Tavares, 2007) até há pouco tempo, indistinguíveis pelos atuais meios de diagnóstico (Felten et al., 2017). Um estudo realizado em 23 amostras recolhidas de animais de três países diferentes (França, Reino Unido e Estado Unidos da América) e com apresentações clínicas diferentes, confirmou a existência de uma grande heterogeneidade antigénica nos isolados de CVF e a variabilidade de locais de ligação ao antígeno relacionados com a cápside proteica do

vírus (Poulet et al., 1999). No entanto não encontraram evidências da existência de biótipos do vírus, possivelmente porque das 23 amostras do estudo anterior, apenas quatro animais apresentavam lesões orais crônicas compatíveis com GEFC.

Neste contexto, é também possível que existam determinados fenótipos felinos que favoreçam a ocorrência de lesões mais exuberantes deste vírus, seja por resposta imunitária ineficaz do próprio animal (Belgard et al., 2010), por imunodeficiência local, ou por uma reação de hipersensibilidade do tipo III. Alterações da produção de imunoglobulinas podem ocorrer devido a uma variedade de doenças, quer sejam infecciosas, autoimunes, imunitárias ou linfoproliferativas (Harley, Gruffydd-Jones & Day, 2003). Harley et al. (2003), estudaram o nível de imunoglobulinas salivares e séricas dos gatos com GEFC e encontraram diferenças significativas na concentração de IgA entre os gatos saudáveis e os gatos com doença. Os gatos com GEFC possuíam concentrações salivares de IgA mais baixas e concentrações séricas mais altas em relação aos controlos. Estes achados evidenciaram que a deficiência relativa de IgA salivar em gatos com GEFC pode estar associada com fatores locais e não a deficiência na produção sistémica de IgA. A IgA proporciona uma proteção imunológica local, neste caso oral, neutralizando agentes tóxicos e patogénicos, inibindo a sua aderência ou a multiplicação de microorganismos na mucosa oral ou na superfície dos dentes. Assim, níveis mais baixos de IgA em gatos com GEFC pode ser um fator importante na patogenia da doença, predispondo estes animais a infeções orais repetidas e persistentes. As reações de hipersensibilidade do tipo III baseiam-se na formação de complexos imunes, que podem ocorrer de duas formas: reação local ou sistémica. Para o caso da GEFC propõe-se a teoria da hipersensibilidade do tipo III local à presença de antigénios de CVF. Nesta reação, quando um antigénio é depositado, como seja subcutaneamente e o animal já apresenta um grande nível de anticorpos na sua circulação sanguínea, vai ocorrer, dentro de algumas horas, um episódio de inflamação aguda, com chamada/libertação de células e mediadores inflamatórios. A esta reação chamamos de reação de Arthus, onde se irá desenvolver rubor, edema e eventualmente hemorragia e trombose. Os complexos imunes formados nos tecidos vão ter de ser removidos existindo ativação do complemento e chegada ao local de macrófagos, neutrófilos e mastócitos, células características das bióspias da mucosa oral dos gatos com GEFC. Embora a reação clássica de Arthus seja produzida num local de administração de um antigénio num animal hiperimunizado, qualquer situação em que exista a deposição de complexos imunes nos tecidos pode desencadear a mesma resposta. Experimentalmente, a reação de Arthus é frequentemente produzida na pele visto ser o local mais conveniente de administração. Contudo, reações locais do tipo III podem ocorrer em diversos tecidos, dependendo da localização do antigénio (Tizard, 2013c). Cita-se como exemplo a pneumonia por hipersensibilidade do tipo III nos bovinos, por estimulação

crónica causada pela inalação de esporos de *Saccharopolyspora rectivirgula*, presentes em fenos contaminados. Quando o animal é alimentado durante longos períodos com esse feno, com constante inalação dos esporos, ocorre sensibilização e o desenvolvimento de altos títulos de anticorpos. Quando os antígenos dos esporos encontrarem os anticorpos nas paredes dos alvéolos pulmonares irá resultar na formação de complexos imunes com ativação do complemento, causando pneumonia, baseada numa reação de hipersensibilidade do tipo III. As lesões consistem em alveolite aguda com vasculite e exsudação de fluído para o espaço alveolar. Os septos alveolares ficam espessados e toda a lesão infiltrada com células inflamatórias. O exame dos pulmões afetados com imunofluorescência demonstra depósitos de imunoglobulinas, do complemento e de antígenos (Tizard, 2013c). A teoria aqui sugerida será uma reação semelhante à anterior, sendo neste caso o antígeno o CVF. Como o local de infeção é sobretudo nasal, conjuntival e oral, a reação ocorre no local de inoculação, sendo a mucosa oral um possível alvo para a ocorrência desta resposta inflamatória. Podemos supor que devido ao CVF possuir diversas estirpes com reação cruzada, também animais já infetados com uma estirpe, com conseqüente produção de anticorpos, desenvolvam uma reação de hipersensibilidade do tipo III de forma cruzada, quando expostos a uma nova estirpe. Outros fatores intrínsecos ao animal, que poderíamos denominar por fatores perpetuadores, prolongariam este estado inflamatório, como seja a deficiência de IgA na saliva, como já foi descrito, ou mesmo a presença de doença local, nomeadamente doença periodontal.

Oitenta por cento dos gatos do grupo doentes apresentavam lesões de RD. Este achado é superior ao descrito por outros autores, que apontam para uma ocorrência deste tipo de lesões em cerca de metade dos animais, não existindo diferenças entre a ocorrência de RD e a presença ou não de GECF (Farcas et al., 2014). Esta diferença pode ser atribuída ao acaso devido ao número reduzido de animais.

A resposta ao tratamento cirúrgico no presente estudo foi semelhante ao anteriormente descrito por Jennings et al. (2015), que refere melhorias claras em 67% dos animais e cura clínica em 28%. Estes resultados demonstram a falta de eficácia do tratamento cirúrgico enquanto tratamento único para esta doença, reforçando a necessidade de tratamento crónico farmacológico. Esta recomendação já foi sugerida por outros autores (Jennings et al., 2015; Lommer, 2013; Hennet et al., 2011) não existindo ainda um consenso relativamente ao tipo de tratamento farmacológico indicado.

Todos os gatos do grupo doentes apresentaram lesões clínicas de elevada gravidade, sendo a presença de lesões de estomatite e mucosite caudal consistentes. Um estudo recente (Druet & Hennet, 2017) não observou uma correlação entre a gravidade das lesões e o tempo necessário para atingirem melhorias clínicas. Contudo, gatos com lesões de estomatite de

gravidade mais baixa, melhoraram significativamente mais depressa. Devido ao reduzido número da amostra não foi possível estabelecer uma associação com significado estatístico entre a gravidade das lesões e a resposta ao tratamento, embora se tenha observado uma diminuição da inflamação após o tratamento cirúrgico em área e gravidade.

A média de valores obtidos de AGP no grupo de controlo assemelhou-se aos valores obtidos em estudos anteriores (Giordano et al, 2004; Selting et al., 2000; Winkel et al., 2015), embora o método de doseamento não tenha sido o mesmo. Os autores referidos optaram pelo método de RID, enquanto que o presente estudo optou pelo de ELISA. Quanto aos valores de AGP no grupo com doença, os valores obtidos ($0,44 \pm 0,15$ mg/mL) foram igualmente semelhantes aos dos autores referidos. Contudo, estes valores não traduzem a verdadeira concentração obtida, uma vez que, em três casos, os valores foram superiores ao valor máximo de absorvância detetada no espectrofotómetro, havendo necessidade de maior diluição da amostra para nova leitura. Devido ao número limitado de poços disponíveis na placa de leitura e à indisponibilidade financeira para a aquisição de uma nova placa, não foi possível realizar as necessárias diluições e proceder a novas leituras. Giordano et al. (2004) apresenta valores de 1,26-4,18 mg/mL em gatos com infeção por coronavírus felino, Selting et al. (2000) apresenta, por sua vez, valores entre 0,12-0,88 mg/mL e Winkel et al. (2015) valores médios de 0,83mg/mL, ambos em gatos com neoplasias.

Um estudo anterior, Simões (2016) verificou que a doença periodontal em cães se encontra associada a um aumento das proteínas de fase aguda, e que o seu tratamento ou controlo reverte este estado inflamatório sistémico. No presente estudo, os valores obtidos de AGP no grupo de estudo, comparativamente com o grupo controlo foram significativamente superiores, sugerindo o impacto sistémico da GECE. Não existiam anteriormente quaisquer estudos no gato que avaliassem as proteínas de fase aguda em doenças orais, pelo que este trabalho contribui para o conhecimento do impacto sistémico da GECE, à semelhança do que se verifica para a doença periodontal do cão (Kouki et al., 2013) e do homem (Chandy et al., 2017).

Foi possível observar o impacto do tratamento cirúrgico nos níveis de AGP, não existindo, contudo, uma resposta consistente em todos os casos. Este facto suporta a insuficiente resposta ao tratamento cirúrgico enquanto abordagem única destes casos. Os estudos efetuados até ao momento e a opinião dos especialistas favorecem a abordagem terapêutica cirúrgica, com extrações dentárias, como abordagem terapêutica central da GECE (Jennings et al., 2015; Lommer, 2013; Hennes et al., 2011). No entanto, estes mesmos autores identificam um conjunto de animais, com pior prognóstico, que naturalmente serão refratários a este tratamento. A seleção da amostra de estudo teve como objetivo selecionar os animais sem co-morbilidades

associadas, e no decorrer do estudo, verificou-se que pela positividade dos animais, do grupo doentes, a calicivírus, e pelas lesões orais apresentadas, estomatite e mucosite caudal, estes se enquadram no grupo descrito pelos autores, anteriormente referidos, como eventuais refratários ao tratamento. De facto, após o tratamento cirúrgico, a reversão do estado inflamatório pelo doseamento da AGP apenas se verificou num terço dos doentes. Os restantes aparentemente não beneficiaram deste procedimento ou beneficiaram pouco do ponto de vista sistémico, contudo, verificou-se uma melhoria dos sinais clínicos em 80% do total da amostra. Novamente, estes valores vão de encontro ao relatado pelos estudos anteriores, que indicam que a recuperação ou cura é de cerca de 67% (Jennings et al., 2015).

Destacamos ainda cinco casos em que se verificou um aumento da AGP nos momentos seguintes ao procedimento (dia 30) (3 casos) ou, em que esta permaneceu sempre elevada e inalterada (2 casos). É possível que, nestes casos a doença inflamatória esteja para lá da inflamação local e ser uma - síndrome inflamatória sistémica- ou, que estes animais constituam fenótipos especiais que exijam uma abordagem mais dirigida.

De uma forma geral, a média dos graus das lesões avaliadas (estomatite, mucosite caudal e área total das lesões) nos vários períodos de estudo, desceu, embora que apenas o grau das áreas totais das lesões possua significado estatístico ($p=0,04$), o que corresponde à diminuição da inflamação oral. Comparando estas variáveis com a concentração sérica pré-cirúrgica de AGP, apenas a mucosite caudal possui relação estatisticamente significativa com esta, ou seja, animais com apresentações de mucosite caudal mais graves, possuem também níveis de AGP mais elevados, apresentando um estado inflamatório superior. Verificou-se também que após o tratamento cirúrgico, animais com graus mais baixos de estomatite apresentavam valores de AGP comparativamente mais baixos ($p=0,03$).

a. Qual o benefício do doseamento da AGP na GEFCF?

Este estudo confirmou que a concentração sérica de AGP está significativamente aumentada em gatos com GEFCF. Concentrações elevadas de AGP já tinham sido descritas em várias doenças no homem e no cão, tanto em inflamações agudas como crónicas (Selting et al., 2000). Também no gato a AGP surge aumentada em diversas doenças (Kajikawa et al., 1999; Terwee et al., 1998; Paltrinieri et al., 2007; Selting et al., 2000). Embora se encontre na literatura um estudo descrevendo o aumento da concentração sérica de AGP em gatos infetados com CVF (Terwee et al., 1997), este estudo incluiu apenas um caso com GEFCF. Não existe, no conhecimento do autor, estudos anteriores que avaliem e comparem a concentração de AGP em gatos com GEFCF, com um grupo de gatos saudáveis e após extrações dentárias.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de AGP aos dias 0 e 60, podemos apenas realçar que só em 3/10 dos animais se verificou uma diminuição dessa concentração.

A concentração de AGP parece estar relacionada com o grau inicial de mucosite caudal, sendo esta relação estatisticamente significativa ($p=0,03$). Assim, concluímos que, quanto mais grave é a mucosite caudal, mais alta é a concentração da AGP, pelo que poderá ser um biomarcador útil na identificação dos casos que serão logo à partida refratários ao tratamento cirúrgico. Ou seja, na presença de mucosite caudal é possível que um gato com valores mais elevados de AGP não venha a beneficiar tão linearmente do tratamento cirúrgico. A estomatite teve igualmente uma correlação positiva e estatisticamente significativa com a concentração de AGP nas reavaliações pós-cirúrgicas, ou seja, animais com estomatites mais graves no dia 30 e 60 apresentavam também um estado inflamatório mais elevado.

Os animais que obtiveram graus de EDT mais elevados, ou seja, melhor resposta clínica ao tratamento cirúrgico, possuíram concentrações de AGP, mais baixas, no dia 60, estando esta relação próxima da significância estatística ($p=0,055$). Por outro lado, a AGP inicial (dia 0) não possui significado estatístico em relação à EDT, não podendo a concentração da AGP inicial ser extrapolada para o possível sucesso ou insucesso do tratamento cirúrgico. Permitindo sugerir que um gato mesmo com um fenótipo mais grave – mucosite caudal e nível elevado de AGP – ainda poderá beneficiar do tratamento cirúrgico, mas necessitará claramente de tratamento farmacológico a longo prazo, para controlar o seu estado inflamatório crónico sistémico.

b. Limitações do estudo

O presente trabalho teve limitações intrínsecas aos animais e na técnica de doseamento selecionada. Dentro das limitações intrínsecas do estudo destaca-se o tamanho reduzido da amostra e a impossibilidade de emparelhar os doentes e os controlos no que diz respeito ao fator idade, embora os grupos se encontrassem emparelhados em relação ao peso vivo, ao sexo e à raça. A escolha de animais mais jovens foi uma escolha ponderada tentando garantir a ausência de co-morbilidades com influência na determinação dos parâmetros de estudo. A pesquisa de infeção por CVF deveria ter sido transversal aos dois grupos. Está descrito o aumento da concentração sérica de AGP em gatos infetados com CVF (Terwee et al., 1997). Assim o grupo dos doentes deveria possuir gatos infetados e não infetados com o vírus para que a comparação da concentração de AGP fosse realizada. No entanto, tal como discutido anteriormente, o grupo controlo não apresentava quaisquer sinais de doença local ou sistémica e o doseamento do CVF

não fazia parte do painel de avaliação pré-cirúrgica dos animais do grupo controlo. As análises deste grupo foram totalmente suportadas pelos clientes, uma vez que os controlos resultaram de animais avaliados para cirurgia eletiva e a pesquisa deste vírus também constituía um gasto adicional não justificável perante o cliente.

As limitações técnicas resultaram sobretudo das restrições financeiras do estudo que suportou apenas a aquisição de uma placa de ELISA para o doseamento da AGP. Esta placa possui um número limitado de poços, não sendo possível re-testar amostras em casos de necessidade de confirmação. Foi o caso de dois valores obtidos (em duplicado) com absorvâncias muito discrepantes, e o caso de medições com valores superiores ao intervalo de absorvância (0-4) lida pelo espectrofotómetro no comprimento de onda selecionado (450nm). Assim, foram excluídos 2 animais da população em estudo (1C e 6E), após o doseamento da AGP, por apresentarem valores duplicados de absorvância muito discrepantes. Caso a re-testagem fosse possível, os valores de absorvância seriam esclarecidos e os animais continuariam no estudo uma vez que estas discrepâncias podem ter sido atribuídas a erros laboratoriais, de pipetagem, ou mesmo da própria máquina de espectrofotometria.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A AGP é uma proteína de fase aguda com utilidade na avaliação do impacto sistémico da GECF no gato e, embora os resultados obtidos sejam ainda preliminares, tem um potencial de utilização como fator de mau prognóstico no tratamento cirúrgico.

No presente estudo observou-se que, à semelhança do verificado em outras doenças sistémicas, a proteína aumenta na presença de GECF. A análise laboratorial realizada foi bastante específica para a espécie felina, permitindo assim uma determinação muito precisa dos valores séricos.

Este estudo reforça a necessidade da investigação clínica nesta doença, com estudos prospetivos que possam investigar biomarcadores de monitorização da doença, e comparar de forma mais padronizada protocolos terapêuticos médicos e cirúrgicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. (2015). Innate Immunity. In *Cellular and Molecular Immunology* (8th ed). (pp. 51-86). Philadelphia, USA: Saunders Elsevier.

American Veterinary Dental College (1998). Information for Pet Owners - Periodontal Disease. Acedido em Jul. 20, 2018, em <https://www.avdc.org/periodontaldisease.html>.

Andersson, S., Gorrel, C. & Verhaert, L. (2013). Anatomy of the teeth and periodontium. In *Veterinary Dentistry for the General Practitioner*. (2nd ed). Pilley, UK: Saunders Elsevier.

Andersson, S., Gorrel, C. & Verhaert, L. (2013b). Resorptive lesions. In *Veterinary Dentistry for the General Practitioner* (2nd ed) (pp. 129-140). Pilley, UK: Saunders Elsevier.

Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F., Kol, A., Walker, N., Badgley, M., Fazel, N., Murphy, W., Vapniarsky, N. & Borjesson, D. (2016). Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 75-86.

Arzi, B., Murphy, B., Cox, D., Vapniarsky, N., Kass, P. & Verstraete, F. (2010). Presence and quantification of mast cells in the gingiva of cats with tooth resorption, periodontitis and chronic stomatitis. *Archive of Oral Biology*, 55, 148-54.

Baumann, H. & Gauldie, J. (1994) The acute phase response. *Immunol Today*, 15, 74-80.

Baumann, H., Morella, K., Jahreis, G. & Marinković, S. (1990). Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 5967-5976.

Baybutt, H. & Holsboer, F. (1990). Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology*, 127, 476-480.

Beckman, B. (2010). Gingival Hyperplasia. NAVC Clinician's Brief: Consultant on call, Jan 2010, 11-14. Acedido em Maio, 2018 em <https://www.cliniciansbrief.com/article/gingival-hyperplasia>.

Bellei, E., Dalla, F., Masetti, L., Pisoni, L. & Joechler, M. (2008). Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). *Veterinary Research Communications*, 32, 231-234.

Bellows, J. (2010). Anatomy. In *Feline Dentistry: Oral Assessment, Treatment, and Preventative Care* (pp.5-27). Iowa, USA: Wiley-Blackwell

Bellows, J. (2010a). Oral Pathology. In *Feline Dentistry: Oral Assessment, Treatment, and Preventative Care* (pp. 101-149). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

Belgard, S., Truyen, U., Thibault, J., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2010). Relevance of Feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, feline herpesvirus and Bartonella henselae in cats with chronic gingivostomatitis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 123, 369-76.

Bence, L., Addie, D. & Eckersall, P. (2005). An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 335-340.

Binns, S., Dawson, S., Speakman, A., Cuevas, L., Hart, C., Gaskell, C., Morgan, K. & Gaskell, R (2000). A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *Journal Feline Medicine and Surgery*, 2, 123–133.

Bochsler, P. & Slauson, D. (2002). Inflammation and Repair of Tissue. In: *Mechanism of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology* (3rd ed.) (pp. 140-245). St. Louis, USA: Mosby.

Bories, P., Feger, J., Benbernou, N., Rouzeau, J., Agneray, J. & Durand, G. (1990). *Inflammation*, 14, 315-323.

Boutten, A., Dehoux, M., Deschenes, M., Rouzeau, J., Bories, P, Durand, G. (1992). *European Journal of Immunology*, 22, 2687-2695.

Callahan, G. & Yates, R. (2014). Veterinary Clinical Laboratory Immunology. In Warren, A. *Basic Veterinary Immunology* (pp. 295-317). Boulder, Colorado: University Press of Colorado.

Cerón, J., Eckersall, P., Martinez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 85-99.

Chandy, S., Joseph, K., Sankaranarayanan, A., Issac, A., Babu, G., Wilson, B. & Joseph, J. (2017). Evaluation of C-Reactive Protein and Fibrinogen in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis: A Clinico-Biochemical Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11, ZC41-ZC45.

Correa, S., Mauldin, G., Mauldin, G. & Mooney, S. (1998). Alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *VCS Proc*, 17.

Cotter, P. (2015). Are peripheral Mott cells an indication of stress or inefficient immunity? *Poultry Science*, 94, 1433–1438.

Coutts, A., Dawson, S., Willoughby, K. & Gaskell, R. (1994) Isolation of feline respiratory viruses from clinically healthy cats at UK shows. *Veterinary Record*, 135, 555-556.

Cray, C., Zaias, J., & Altman, N. (2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59, 517–526.

DentalVets (2011). *Feline Oral Cavity Disease*. Acedido em Mar, 22, 2018 em <http://www.dentalvets.co.uk/docs/FelineDentalDisease2011.pdf>

Dinarello, C. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *The Annual Review of Immunology*, 27, 519-550.

Dolieslager, S. (2012). *Studies on the aetiopathogenesis of feline chronic gingivostomatitis*. Ph.D. Thesis. Glasgow: College of Medicine, Veterinary and Life Sciences

University of Glasgow.

Dolieslager, S., Riggio, M., Lennon, A., Lappin, D., 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, 93–98.

Dowers, K., Hawley, J., Brewer, M., Moris, A., Radecki, S. & Lappin, M. (2010). Association of Bartonella species, Feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 314–21.

Druet, I. & Hennes, 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, 209.

Duarte, A. & Tavares, L. (2007). Utilização de um ensaio de RT-PCR - nested PCR para avaliação da infecção do Coronavírus Felino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 65-70.

DuPont, G. (2008). Periodontal Disease: When to Treat and When to Wait. *British Small Animal Veterinary Congress 2008*. Acedido em Mar., 23, 2018 em <https://www.vin.com/PFAutil/content/defaultadv1.aspx?pId=11254&catId=32201&id=3862978>

Duthie, S., Eckersall, P., Addie, D., Lawrence, C. & Jarrett., O. (1997). Value of α 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *The Veterinary Record*, 141, 299–303.

Dyce, K., Sack, W. & Wensing, C. (2010). The Digestive PFAaratus: The mouth. In *Textbook of Veterinary Anatomy*. (4th ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Eckersall, P. (2008). Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In Kaneko, J., Harvey, J. & Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6th ed.) (pp 117-155). USA, Elsevier.

Ellis, T. (1981). Feline respiratory virus carriers in clinically healthy cats. *Australian Veterinary Journal*, 57, 115-118.

Evans, H. & Lahunta, A. (2013). The Digestive apparatus and Abdomen: Oral Cavity. In *Miller's Anatomy of the Dog*. (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Farcas, N., Lommer, M., Kass, P., Verstraete, F. (2014) Dental radiographic findings in cats with chronic gingivostomatitis (2002-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244, 339-345.

Felten, S., Leutenegger, C., Balzer, H., Pantchev, N., Matiasek, K., Wess, G. & Hartmann, K. (2017). Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis. *BMC Veterinary Research*, 13, 228.

Fernandez, M., Manzanilla, E., Lloret, A., León, M. & Thibault, J. (2017). Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Mycoplasma felis DNA and

associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19, 461-469.

Flower, D. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *The Biochemical Journal*, 318, 1-14.

Fournier, T., Medjoubi-N, N., Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482,157-71.

Gaskell, R., Radford, A. & Dawson, S. (2004). Feline infectious respiratory disease. In: Chandler, G. & Gaskell, R. *Feline Medicine and Therapeutics* (3rd ed) (pp. 577–595). Portland, USA: Blackwell Publishing,

Giordano, A., Spagnolo, V., Colombo, A. & Paltrinieri, S. (2004). Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *The Veterinary Journal*, 167, 38-44.

Gómez-Laguna, J., Salguero, F., Pallarés, F., Rodríguez-Gómez, I., Barranco, I. & Carrasco, L. (2011). Acute Phase Proteins as Biomarkers in Animal Health and Welfare. In Veas, F. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. Rijeka, Croatia: InTech.

Gorrel, C. (2008). Chronic Gingivostomatitis, In *Saunders Solutions in Veterinary Practice*. UK: Elsevier.

Gorrel, C. (2015). Tooth Resorption in Cats. Pathophysiology and treatment options. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17, 37–43.

Gracis, M. (2015). Inflammatory Oral Diseases in Cats. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2015*. Acedido em Fev., 2018, disponível em <https://www.vin.com/PFAutil/content/defaultadv1.aspx?pId=14365&catId=73677&id=7259299&ind=35&objTypeID=17&print=1>.

Green, C. (2012). Feline Respiratory Disease. In *Infectious Diseases Of The Dog And Cat*, (4th ed.). (pp. 151-162). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

Gruys, E., Toussaint, M., Niewold, A. & Koopmans, J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University*, 11, 1045-1056.

Harbour, D., Howard, P. & Gaskell, R. (1991) Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Veterinary Record*, 128, 77-80.

Healey, K., Dawson, S., Burrow, R., Cripps, P., Gaskell, C., Hart, C., Pinchbeck, G., Radford, A., Gaskell, R. (2007). Prevalence of feline chronic gingivostomatitis in first opinion veterinary practice. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 9, 373–381.

Harley, R., Gruffydd-Jones, J. & Day, J. (2011). Immunohistochemical Characterization of Oral Mucosal Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Journal of Comparative Pathology*, 144, 239-250.

Harley, R., Gruffydd-Jones, J. & Day, J. (2003). Salivary and serum immunoglobulin

levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Veterinary Record*, 152, 125-129.

Harley, R., Helps, C., Harbour, D., Gruffydd-Jones, T. & Day, M. (1999). Cytokine mRNA Expression in Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 471-478.

Hennet, P. (2014). Feline Chronic Gingivostomatitis. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. Acedido em Mar, 29, 2018 em <https://www.vin.com/PFAutil/content/defaultadv1.aspx?pId=12886&catId=57092&id=7054896&ind=55&objTypeID=17&print=1>

Hennet, R., Camy, A., McGahie, M., Albouy, V. (2011) Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: a randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13, 577-87.

Hochepped, T., Berger, F., Baumann, H. & Libert, C. (2003). 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14, 25-34.

Hochepped, T., Van Molle, W., Bergeri, F., Baumann, H. & Liber, C. (2000). Involvement of the Acute Phase Protein α 1-Acid Glycoprotein in Nonspecific Resistance to a Lethal Gram-negative Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 20, 1403-1409

Holst, B., Berndtsson, L. & Englund, L. (2005). Isolation of feline herpesvirus-1 and feline calicivirus from healthy cats in Swedish breeding catteries. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 325-331.

Horadagoda, N., Knox, K., Gibbs, H., Reid, S., Horadagoda, A., Edwards, S., Eckersall, P. (1999). Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record*, 144, 437-441.

Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3, 118–127.

Jennings, M., Lewis, J., Soltero-Rivera, M., Brown, D. & Reiter, A. (2015). Effect of tooth extraction on stomatitis in cats: 95 cases (2000–2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246, 654-660.

Johnston, N. (2012). An updated approach to chronic feline gingivitis stomatitis syndrome. *Veterinary Practice*, 44, 34-38.

Kajikawa, T., Furuta, A., Onishi, T., Tajima, T. & Sugii, S. (1999). Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. In *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68, 91-98.

Kann, R., Seddon, J., Henning, J. & Meers, J. (2012) Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Research in Veterinary Science*, 93, 649-654.

Kornya, M. Little, S., Scherk, M., Sears, W. & Bienzle, D. (2014). Association between oral health status and retrovirus test results in cats. *Journal of the American Veterinary Medical*

Association, 245, 916-922.

Kouki, M., Papadimitriou, S., Kazakos, G., Savas, I. & Bitchava, D. (2013). Periodontal Disease as a Potential Factor for Systemic Inflammatory Response in the Dog. *Journal of Veterinary Dentistry*, 30.

Leal, R. (2014). *Recombinant feline interferon omega therapy in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus: clinical, viral and immunological relevance*. Ph.D. Thesis. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Lewis, J., Tsugawa, A., Reiter, A. (2007). Use of CO₂ laser as an adjunctive treatment for caudal stomatitis in a cat. *Journal of Veterinary Dentistry*, 24, 240–249.

Lommer, M. (2013). Efficacy of Cyclosporine for Chronic, Refractory Stomatitis in Cats: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Clinical Study. *Journal of Veterinary Dentistry*, 30, 8-17.

Lommer M. & Verstraete, F. (2003). Concurrent oral shedding of Feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 18, 131–4.

Lobprise, H. (2012). Stomatitis. In *Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion: Small animal dentistry* (2nd ed.) (pp. 237-242). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

Lyon, K. (2005). Gingivostomatitis. *Veterinary Clinical Small Animal* 35, 891-911.

Mancini, G., Carbonara, A. & Heremans, J. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235–254.

MacLachlan, N. & Dubovi, E. (2017). Caliciviridae e Astroviridae. In *Fenner's Veterinary Virology* (5th ed.) (pp. 505-506). London, UK: Elsevier.

Mestrinho, L., Castejón, A., Gordo, I., Serrano, M., Requicha, J., Velázquez, I. & Niza, M. (2015). Patologia. In *Estomatologia do Gato* (1^a ed.) (pp. 39-67). Lisboa: Lisboa.

Mihaljevic, S. (2003). First clinical experiences with omega-Interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-oropharyngitis of cats. *Der Praktische Tierarzt*, 83.

Mochizuki, M., Kawakami, K., Hashimoto, M. & Ishida, T. (2000). Recent epidemiological status of feline upper respiratory infections in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62, 801–803.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28–40.

Murphy, K. & Weaver, C. (2017). Induced innate responses to infection. In *Janeway's Immunobiology* (9th ed.) (pp. 121-122). New York: USA. Garland Science, Taylor & Francis Group.

Niemiec, B., Gawor, J., Nemeč, A., Clarke, D., Tutt, C., Gioso, M., Stegall, P., Chandler, M., Morgenegg, G., Jouppi, R. & Stewart, K. (2017). *World Small Animal Veterinary Association Global Dental Guidelines*. WSAVA. Acedido em Out. 29, 2017, em

Niza, M., Mestrinho, L., Vilela, C. (2004). Gengivo-estomatite crónica felina – um desafio clínico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 127-135.

Norsworthy, G. (2011). Calicivirus Infection. In Norsworthy, G. Grace, S., Crystal, M., Tilley, L., *The Feline Patient* (4th ed.). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

Oliveira, J. R. A. D. (2017). Avaliação Retrospectiva Do Tratamento De Gengivoestomatite Crónica Felina Em 80 Casos Clínicos. Dissertação de Mestrado Integrado de Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Paltrinieri, S., Metzger, C., Battilani, M., Pocacqua, V., Gelain, E. & Giordano, A. (2007). Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 271-277.

Paltrinieri, S., (2007a). Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase protein. *Veterinary Research Communications*, 31,125-129.

Paltrinieri, S., Giordano, A., Tranquillo, V., Guazzetti, S. (2007b). Critical assessment of the diagnostic value of feline a1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios PFARoach. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 266-272.

Papich, M. (2018) Immunosuppressive Drugs. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (10th ed.) (pp.1227-1232). Iowa, USA: JohnWiley & Sons, Inc.

Paul, I & William, E. (2013). The Intedeukin-1 Family In Dinarello, C & Netea, M. *Fundamental immunology* (7th ed.). (pp. 639-658). Philadelphia, USA

Pawlina, W. & Ross, M. (2016). Digestive System I: Oral Cavity and Associated Structures. In *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. (7th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.

Pedersen, N. (1992). Inflammatory oral cavity diseases of the cat. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 22, 1323-45.

Pedersen, N. & Hawkins, K. (1995). Mechanisms for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination. *Veterinary Microbiology*, 47, 141-56.

Petersen, H., Nielsen, J. & Heegaard, P. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163–187.

Perry, R. & Tutt, C. (2014). Periodontal disease in cats: Back to basics – with an eye on the future. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17, 45-65.

Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14, 185–191.

Pinto, C. (2016). Portugal tem 6,7 milhões de animais de estimação. *Veterinária Atual*. Acedido em 20 Jul., em <http://www.veterinaria-atual.pt/na-clinica/portugal-tem-67-milhoes-de-animais-de-estimacao/>

Poulet, H., Brunet, S., Soulier, M., Leroy, V., Goutebroze, S. & Chappuis, G. (1999). Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies. *Archive of Virology*, 145, 243–261.

Quimby, J., Elston, T., Hawley, J., Brewer, M., Miller, A. & Lappin, M. (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 and Surgery*, 10, 66-72.

Radford, A., Addie, D., Blák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, B., Hosie, M., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009) Feline Calicivirus Infection: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 556-564.

Radford, A., Dawson, S., Coyne, K., Porter, C. & Gaskell, R. (2006). The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Veterinary Microbiology*, 117, 14-8.

Ramalho, V., Ramalho, H., Cipullo, J. & Burdmann, E. (2003). Hiperplasia Genival Induzida Por Ciclosporina A. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 49, 210-3.

Reginaldo, P., Keytyanne, O., Assis, R., Didier, Q., Evangelista, J. & Monteiro, M. (2017). Gingivostomatitis and Feline Immunodeficiency Virus. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 3, 3-6.

Reiter, M. (2016). Update on Oral Inflammation. In August's Consultations in Feline Internal Medicine (v.7) (pp. 141-143). St. Louis: Elsevier.

Reiter, A.M., Soltero-Rivera, M.M. (2017). Oral and Salivary Gland Disorders; Oral Inflammation. In Ettinger, S., Feldman, E., Côté, E., *Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the dog and the cat* (8th ed.) St. Louis, Missouri: Elsevier.

Reiter, A. & Mendonza, K. (2002). Feline odontoclastic resorptive lesions. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 32, 791 – 837.

Reubel, G, Hoffmann, D. & Pedersen, N. (1992). Acute and Chronic Fournier's Gangrene of Domestic Cats: A Feline Calicivirus-Induced Disease. *Feline Dentistry*, 22, 1347-1360.

Robson, M., Crystal, M. A. (2011). Gingivitis - Stomatitis – Pharyngitis. In Norsworthy, G. Grace, S., Crystal, M., Tilley, L., *The Feline Patient* (4th ed.). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.

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

Rusbridge, C., Heath, S., Gunn-Moore, D., Knowler, S., Johnston, N. & McFadyen, A. (2010). Feline orofacial pain syndrome (FOPS): A retrospective study of 113 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 498-508.

Salgado, F. J., Arias, P., Canda-Sánchez, A. & Nogueira, M. (2011). Acute Phase

Proteins as Biomarkers of Disease: From Bench to Clinical Practice. In Veas, F. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. Rijeka, Croatia: InTech.

Squarzoni, P., Bani, D., Cialdai, F. & Monici, M. (2017). NIR Laser Therapy in the Management of Feline Stomatitis. *SM Dermatology Journal*, 3, 1-11.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 878-888.

Schönfeld, D., Ravelli, R., Mueller, U. & Skerra, A. (2008). The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *Journal Molecular Biology*, 384, 393-405.

Selting, K., Ogilvie, G., Lana, S., Fettman, M., Mitchener, K., Hansen, R., Richardson, K., Walton, J. & Scherk, M. (2000). Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14, 503-506.

Shida, T., Kuribayashi, T., Seita, T., Maruo, T., Yamazaki, S. & Yamamoto, S. (2012). Characteristics of increased serum amyloid A (SAA) and α -1-acid glycoprotein (AAG) concentrations in cats subjected to experimental surgical treatments or inoculated with *Bordetella bronchiseptica*. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10, 69-75.

Simões, G. (2016). *Avaliação dos Níveis Séricos de Proteína C Reativa em Cães com Doença Periodontal*. Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Southerden, P., Gorrel, C., (2007). Treatment of a case of refractory feline chronic gingivostomatitis with feline recombinant interferon omega. *Journal of Small Animal Practice* 48, 104–106.

Steagall, P., Monteiro-Steagall, B. & Taylor, P. (2014) A review of the studies using buprenorphine in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 762-70.

Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 6, 1-14.

Tamamoto, T., Ohno, K., Ohmi, A., Goto-Koshino, Y. & Tsujimoto, H. (2008). Verification of Measurement of the Feline Serum Amyloid A (SAA) Concentration by Human SAA Turbidimetric Immunoassay and Its Clinical PFAlication. *Journal of veterinary Medical Science*, 70, 1247-1252.

TerWee, J., Lauritzen, A., Sabara, M., Dreier, K. & Kokjohn, K. (1997). Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotropic or a 'limping' strain of feline calicivirus. *Veterinary Microbiology*, 56, 33-45.

TerWee, J., Sabara, M., Kokjohn, K., Sandbulte, J., Frenchick P. & Dreier, K. (1998). Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Veterinary Microbiology*, 59, 259-281.

Thomas, S., Lappin, D., Spears, J., Bennett, D., Nile, C. & Riggio, M. (2017). Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. *Research in Veterinary Science*, 111, 124-126.

Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C. & Mier, J. (1993) *The Journal of Experimental Medicine*, 178, 1629-1636.

Tilley, L. & Smith, F. (2011). Eosinophilic Granuloma Complex in Cats and Eosinophilic Granulomas in Dogs. *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Canine and Feline*, (5th ed.). John Wiley & Sons, Inc. Acedido em Mar., 23, 2018 em http://www.millikenanimalclinic.com/wp-content/uploads/2016/11/eosinophilic_granulomas_complex.pdf.

Tizard, I. (2013). Drugs and Other Agents That Affect the Immune System In *Veterinary Immunology* (9th ed.). (pp. 467-469) St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier

Tizard, I. (2013a). Innate Immunity: Proinflammatory and Antimicrobial Mediators/Systemic Responses to Inflammation. In *Veterinary Immunology* (9th ed.). (pp. 21-74) St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier.

Tizard, I. (2013b). Immunodiagnostic Techniques. In *Veterinary Immunology* (9th ed.). (pp. 494-514) St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier

Tizard, I. (2013c). Immune Complexes and III Hypersensitivity. In *Veterinary Immunology* (9th ed.). (pp. 355-364) St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier

Vasson, M., Roch-Arveiller, M., Couderc, C., Baguet, J. & Raichvarg, C. (1994). *Clinica Chimica Acta*, 224, 65-71.

Verhaert, L., Wette, C. (2004). Survey of oral diseases in cats in Flanders. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 73, 331-40.

White, S. (2003). Eosinophilic Granuloma Complex in Cats and Dogs. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2003*. Acedido em Mar., 23, 20018 em <https://www.vin.com/PFAutil/content/defaultadv1.aspx?meta=Generic&pId=8768&id=3850260>

Wiggs, Robert B. (Robert Bruce) & Lobprise, Heidi B (1997). Oral Anatomy and Physiology. In *Veterinary dentistry: principles and practice*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Williams, J., Weiser, M., Pechet, T., Kobzik, L., Moore, F. & Hechtman, H. (1997). *American Journal of Physiology*, 273, 1031-1035.

Winer, J., Arzi, B. & Verstraete, F. (2016). Therapeutic Management of Feline Chronic Gingivostomatitis: A systematic Review of the Literature. *Frontiers in Veterinary Medicine*, 3, 1-10.

Winkel, V., Pavan, T., Wirthl, V., Alves, A. & Lucas, S. (2015). Serum α -1 acid glycoprotein and serum amyloid A concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. *American Journal Veterinary Research*, 76, 983-988.

ANEXOS

Anexo I - Parecer de aprovação do estudo pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.



UNIVERSIDADE
DE LISBOA

FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA
*Comissão de Ética e Bem-Estar
Animal (CEBEA)*



Exma. Senhora
Professora Doutora Lisa Mestrinho
Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa, 15 de fevereiro de 2018

Assunto: Avaliação do projeto de investigação – N/Ref^o 012/2018

Vimos pela presente informar V.Exa. que a CEBEA, após ter avaliado as actividades que envolvem manipulação de animais, no âmbito do projeto de investigação "Measurement of alfa-2-acid glycoprotein in cats with gingivostomatitis" considerou que estão salvaguardados os princípios éticos e de bem-estar animal exigidos pela legislação vigente e pelo código de boas práticas, pelo que aprovou a execução do protocolo experimental nas instalações e serviços da FMV, conforme requerido por V.Exa.

Com os melhores cumprimentos,

Luis Telo da Gama
Presidente da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal

Anexo II – Questionário realizado aos tutores durante a reavaliação pós-cirúrgica.

Questionário

“Doseamento da alfa-1 glicoproteína ácida em gatos com gengivostomatite crónica”

- 1 - O seu gato vive dentro de casa/tem acesso há rua. Foi resgatado da rua?

- 2 – O seu gato é vacinado? Se sim, com que vacina e quando foi a última administração?

- 3 - O seu gato tem outra doença diagnosticada?

- 3 – Há quanto tempo o seu gato foi diagnosticado com GECF?

- 4 - Quais foram os sinais clínicos que o alertou para a doença?

- 5 – Que tratamentos foram tentados antes da cirurgia?

- 6 – Notou melhorias após as extrações dentárias? Se sim, em que sentido.

Obrigada pela sua participação.

Anexo III - Sistema de avaliação das lesões, classificando o grau de estomatite, de mucosite caudal, e a área total das lesões.

Sistema de Avaliação das lesões						
Paciente					Data	__/__/2018
Raça					Dono	
Idade					Contacto	
Peso					Morada	
Dieta						

Nota: O veterinário tem de atribuir a pontuação adequada de acordo com a intensidade da lesão inflamatória em cada quadrante, separadamente. Coloque um círculo no número que corresponde ao critério que mais se adequa em cada quadrante.

Grau da Estomatite Caudal					
MNE	MND	MLE	MLD	Descrição	
0	0	0	0	Ausência de Lesão	
1	1	1	1	Inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
2	2	2	2	Inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
3	3	3	3	Inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangra espontaneamente, mas sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
4	4	4	4	Inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangra espontaneamente.	

Grau da Mucosite Alveolar/Bucal					
MNE	MND	MLE	MLD	Descrição	
0	0	0	0	Ausência de Lesão	
1	1	1	1	Inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
2	2	2	2	Inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
3	3	3	3	Inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangra espontaneamente, mas sangra quando aplicada um ligeira pressão.	
4	4	4	4	Inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangra espontaneamente.	

Área Total das Lesões		
	Descrição	Localização das Lesões
0	Ausência de área de lesão	
1	Área total de 0 até 0,5 cm ²	
2	Área total de 0,5 até 1 cm ²	
3	Área total de 1 até 2 cm ²	
4	Área total de 2 até 3 cm ²	
5	Área total de 3 até 4 cm ²	
6	Área total > 4 cm ²	

MNE	Mandíbula Esquerda
MND	Mandíbula Direita
MLE	Maxilar Esquerdo
MLD	Maxilar Direito

Obrigado pela sua colaboração.

Anexo IV - Sistema de avaliação dos sinais clínicos, classificando o grau de apetite, nível de atividade, limpeza e higiene assim como do conforto. O questionário foi realizado ao dia 0, 30 e 60. Com os resultados conseguimos classificar a EDT.

Questionário aos Donos			
Paciente		Data	__/__/2016
Raça		Dono	
Idade		Contacto	
Peso		Morada	
Dieta			

Avaliação do Cliente: Coloque um círculo no número que corresponde ao critério que mais se adequa ao seu gato.

Apetite	
0	Come normalmente.
1	Come comida húmida e seca, mas em quantidade inferior ao normal.
2	Come comida húmida sozinho e não come comida seca.
3	Só come comida húmida e apenas quando lha oferece à mão.

Nível de Actividade	
0	Actividade normal - brincalhão e activo.
1	Brinca espontaneamente mas não frequentemente.
2	Pouco activo - Brinca ocasionalmente quando estimulado por pessoas ou outros animais
3	Não se interessa por pessoas ou outros animais, passa a maior parte do tempo a dormir.

Limpeza e Higiene	
0	Faz a sua limpeza e higiene normalmente.
1	Faz a sua limpeza e higiene de um modo excessivo.
2	Faz a sua limpeza e higiene ocasionalmente como não antes.
3	Não faz a sua limpeza e higiene.

Percepção do Nível de Conforto:	
Numa escala de 0-3, sendo 0 o mais confortável e 3 o mais doloroso, classifique o grau de conforto do seu gato:	
0	1 2 3

Obrigado pela sua colaboração.

Anexo V – Descrição do grupo controlo (C) com base na raça, idade, sexo e peso (kg).

Gato	Raça	Idade	Sexo	Peso (kg)
1C	Sem raça indefinida (SRD)	7 meses	Feminino	3
2C	SRD	6 meses	Masculino	4
3C	SRD	7 meses	Feminino	2,6
4C	SRD	6 meses	Feminino	3,15
5C	SRD	1 ano	Masculino	3,8
6C	SRD	6 meses	Feminino	2,95
7C	SRD	8 meses	Feminino	3,5
8C	SRD	6 meses	Feminino	3,65
9C	SRD	7 meses	Feminino	2,95
10C	SRD	8 meses	Masculino	4,2

Anexo VI – Descrição do grupo doentes (E) com base na raça, idade, sexo, peso (kg), cronicidade dos sinais clínicos e procedimento realizado.

Gato	Raça	Idade	Sexo	Peso (kg)	Cronicidade dos sinais clínicos	Procedimento realizado
1E	Sem raça definida (SDR)	13	Feminino	2,8	4meses	Extrações parciais
2E	SDR	13	Feminino	3,5	1 ano	Extrações parciais
3E	SDR	4	Masculino	5	9 meses	Extrações totais
4E	SDR	3	Masculino	5	2anos	Extrações parciais + incisivos mandibulares
5E	SDR	11	Feminino	4,2	1 ano	Extrações parciais
6E	SDR	2	Masculino	4,73	2anos	Extrações parciais + todos os incisivos
7E	SDR	9	Masculino	3,35	2 anos	Extrações parciais + incisivos mandibulares
8E	SRD	5	Feminino	2,5	1 ano	Extrações totais
9E	SDR	4	Feminino	4,7	1 ano	Extrações parciais
10E	SDR	9	Masculino	3,2	1 ano	Extração parcial + todos os caninos

Anexo VII - Sistema de avaliação dos sinais clínicos.

		Gato	Dias		
			0	30	60
Graus	Apetite	1E	3	3	3
		2E	2	1	1
		3E	0	0	0
		4E	2	2	2
		5E	3	3	0
		6E	1	0	0
		7E	1	3	1
		8E	2	0	0
		9E	0	0	0
		10E	1	0	0
	Nível de Atividade	1E	3	2	3
		2E	3	3	2
		3E	0	1	0
		4E	0	0	0
		5E	2	2	2
		6E	0	0	0
		7E	3	3	3
		8E	3	1	1
		9E	0	0	0
		10E	3	1	1
	Limpeza e Higiene	1E	3	0	2
		2E	3	2	2
		3E	0	3	0
		4E	0	0	0
		5E	2	0	0
		6E	0	0	0
		7E	3	3	2
		8E	3	0	0
		9E	2	2	2
		10E	3	2	2
	Conforto	1E	2	1	3
		2E	2	1	1
		3E	1	3	0
		4E	0	0	0
		5E	2	1	0
		6E	1	0	0
		7E	3	3	1
		8E	2	1	0
		9E	2	1	0
		10E	3	3	2

Anexo VIII – Folheto informativo do kit AGP-8 (ELISA) da Life Diagnostics, Inc.

CAT ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN (AGP) ELISA Life Diagnostics, Inc., Catalog Number: AGP-8

INTRODUCTION

AGP is an acute phase protein that is elevated in cat serum due to injury, infection and disease.¹⁻⁴ Kajikawa, et al. reported a 19-fold increase of AGP in serum from hospitalised cats and a 5.7-fold increase after injection of normal cats with lipopolysaccharide.¹ Of the positive acute phase proteins investigated (SAA, AGP, haptoglobin and CRP), they reported that AGP was the most responsive. More recently, Paltrinieri et al., reported AGP to be a powerful discriminating biomarker for diagnosis of feline infectious peritonitis.²

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The assay uses affinity purified cat AGP antibodies for solid phase (microtiter wells) immobilization and horseradish peroxidase (HRP) conjugated cat AGP antibodies for detection. Standards and diluted samples are incubated in the microtiter wells for 45 minutes. The wells are subsequently washed. HRP conjugate is added and incubated for 45 minutes. This results in AGP molecules being sandwiched between the immobilization and detection antibodies. The wells are then washed to remove unbound HRP-conjugate and TMB is added and incubated for 20 minutes. If AGP is present a blue color develops. Color development is stopped by the addition of Stop solution, changing the color to yellow, and absorbance is measured at 450 nm. The concentration of AGP is proportional to absorbance and is derived from a standard curve.

MATERIALS AND COMPONENTS

Materials provided with the kit:

- AGP antibody coated 96-well plate (12 x 8-well strips)
- HRP Conjugate, 11 ml
- AGP stock (lyophilized)
- 20x Wash solution; TBS50-20, 50 ml
- 10x Diluent; YD25-10, 25 ml
- TMB, TMB11-1, 11 ml
- Stop solution, SS11-1, 11 ml

Materials required but not provided:

- Pipettors and tips
- Distilled or deionized water
- Polypropylene or glass tubes
- Vortex mixer
- Absorbent paper or paper towels
- Plate incubator/shaker
- Plate washer
- Plate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Curve fitting software

STORAGE

The unused kit should be stored at 2-8°C and the microtiter plate should be kept in a sealed bag with desiccant. Kits will remain stable for six months from the date of purchase.

GENERAL INSTRUCTIONS

1. All reagents should be allowed to reach room temperature before use.

2. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay is carried out with a complete understanding of the instructions and with adherence to good laboratory practice.
3. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
4. Laboratory temperature will influence absorbance readings. Our ELISA kits are calibrated using shaking incubators set at 150 rpm and 25°C. Performance of the assay at lower temperatures will result in lower absorbance values.

DILUENT PREPARATION

The diluent is provided as a 10x stock. Prior to use estimate the final volume of diluent required for your assay and dilute one volume of the 10x stock with nine volumes of distilled or deionized water.

WASH SOLUTION PREPARATION

The wash solution is provided as a 20x stock. Prior to use dilute the contents of the bottle (50 ml) with 950 ml of distilled or deionized water.

STANDARD PREPARATION

1. The AGP stock is provided lyophilized. Add the volume of distilled or de-ionized water indicated on the vial label and mix gently until dissolved (*the reconstituted standard remains stable for at least 10 days at 2-8°C but should be aliquoted and frozen at -20°C after reconstitution if use beyond this time is intended*).
2. Label 5 polypropylene or glass tubes as 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.13 ng/ml.
3. In the tube labeled 50 ng/ml prepare the 500 ng/ml standard as detailed on the stock vial label.
4. Dispense 250 µl of diluent into the tubes labeled 25, 12.5, 6.25 and 3.13 ng/ml.
5. Prepare the 25 ng/ml standard by mixing 250 µl of the 50 ng/ml standard with 250 µl of diluent in the tube labeled 25 ng/ml.
6. Similarly prepare the remaining standards by two-fold serial dilution.

SAMPLE PREPARATION

We observed AGP concentrations of approximately 0.15 mg/ml in serum of healthy American short haired cats. However, in serum from diseased cats, concentrations can reach 5 mg/ml or greater.¹⁻⁴ To obtain values within the range of the standard curve we suggest that samples initially be diluted 10,000-fold using the following procedure for each sample.

1. Dispense 495 µl of 1x diluent into two tubes.
2. Pipette and mix 5 µl of the serum/plasma sample into the first tube containing. This provides a 100-fold diluted sample.
3. Mix 5 µl of the 100-fold diluted sample with the 495 µl of diluent in the second tube. This provides a 10,000-fold dilution of the sample.

To avoid matrix effects, do not test samples at dilutions below 4000-fold.

Life Diagnostics, Inc., PO Box 5205, West Chester, PA 19380
610-431-7707 – 610-431-7818 (Fax)
info@lifediagnostics.com – www.lifediagnostics.com

ASSAY PROCEDURE

1. Secure the desired number of 8-well strips in the holder. Unused strips should be stored in the re-sealed bag with desiccant at 4°C for future use.
2. Dispense 100 µl of standards and samples into the wells (we recommend that standards and samples be run in duplicate).
3. Incubate on an orbital micro-plate shaker at 150 rpm and 25°C for 45 minutes.
4. Empty and wash the microtiter wells 5x with 1x wash solution using a plate washer (400 µl/well).
5. Strike the wells sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual droplets.
6. Add 100 µl of HRP-conjugate into each well.
7. Incubate on a plate shaker at 150 rpm and 25°C for 45 minutes.
8. Wash as detailed above.
9. Strike the wells sharply onto absorbent paper or paper towels to remove residual droplets.
10. Dispense 100 µl of TMB into each well.
11. Incubate on an orbital micro-plate shaker at 150 rpm at 25°C for 20 minutes.
12. After 20-minutes, stop the reaction by adding 100 µl of Stop solution to each well.
13. Gently mix. It is important to make sure that all the blue color changes to yellow.
14. Read absorbance at 450 nm with a plate reader within 5 minutes.

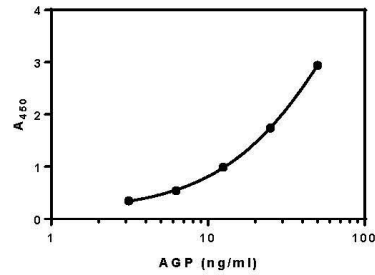
CALCULATION OF RESULTS

1. Using curve fitting software, construct a standard curve by plotting absorbance values of the standards versus log₁₀ of the concentration.
2. Fit the standard curve to a four-parameter logistic regression (4PL) equation (x axis = log₁₀ concentration) and determine the concentration of the samples from the standard curve (remember to derive the concentration from the antilog).
3. Multiply the derived concentration by the dilution factor to determine the actual concentration in the serum or plasma sample.
4. If the A₄₅₀ values of samples fall outside the standard curve, samples should be diluted appropriately and re-tested.

TYPICAL STANDARD CURVE

A typical standard curve is shown below. This curve is for illustration only and should not be used to calculate unknowns. Each user should obtain his or her data and standard curve in each experiment.

AGP (ng/ml)	Absorbance (450 nm)
50	2.940
25	1.741
12.5	0.991
6.25	0.540
3.13	0.347



ASSAY CHARACTERISTICS

Typical results obtained with serum from five American short-haired cats are shown in the table below. Samples were diluted as indicated and concentrations (ng/ml) determined. Serum concentrations (µg/ml) were calculated by multiplying the concentrations of the samples by their respective dilution factors. Average values, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were then calculated.

Sample	Dilution	A450	ng/ml	ug/ml	Average ug/ml	SD (ug/ml)	CV
2325	4000	1.637	31.51	126.1	137.5	10.4	7.5
	8000	0.900	16.51	132.1			
	16000	0.526	8.90	142.4			
	32000	0.318	4.67	149.3			
2326	4000	2.086	40.65	162.6	160.7	8.6	5.4
	8000	1.016	18.87	151.0			
	16000	0.573	9.86	157.7			
	32000	0.352	5.36	171.4			
2327	4000	1.931	37.50	150.0	139.7	12.0	8.6
	8000	0.850	15.49	124.0			
	16000	0.509	8.55	136.8			
	32000	0.316	4.62	148.0			
2328	4000	1.951	37.91	151.6	147.7	5.9	4.0
	8000	0.964	17.81	142.5			
	16000	0.527	8.92	142.7			
	32000	0.325	4.81	153.8			
2329	4000	3.421	67.83	271.3	276.2	18.6	6.7
	8000	1.950	37.88	303.1			
	16000	0.919	16.90	270.4			
	32000	0.488	8.13	260.0			

REFERENCES

1. Kajikawa, et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α-1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol.* 68(1):91-98 (1999)
2. Patrineri S, et al. Critical assessment of the diagnostic value of feline α-1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. *J Vet Diagn Invest.* 19:266-272 (2007)
3. Shida T, et al. Characteristics of increased serum amyloid A (SAA) and α-1-acid glycoprotein (AAG) concentrations in cats subjected to experimental surgical treatments or inoculated with *Bordetella bronchiseptica*. *Intern J Appl Res Vet Med.* 10(1):69-75 (2012)
4. Selting KA, et al. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med.* 14:503-506 (2000)

Rev 121017

Tech support: techsupport@ifediagnosics.com

Anexo IX – Leitura das Absorvâncias e respectivo tratamento dos resultados através do programa GraphPad Prism 7 para obtenção da reta de calibração (dos valores padrão) e das concentrações de AGP (mg/mL).

concentração (ng/ml)	ABS (450nm)		Média	Concentração (ng/mL)	x f dil	Conc mg/mL
3,13	0,309	0,2535	0,28125			
6,25	0,4652	0,4943	0,47975			
12,5	0,8774	0,9177	0,89755			
25	1,7401	1,751	1,74555			
50	3,2471	3,279	3,26305			
1c	1,7786	4	1,7786	26,36	263557,99	0,26
2c	1,4001	1,2975	1,3488	19,62	196191,22	0,20
4c	1,5429	1,4146	1,47875	21,66	216559,56	0,22
6c	2,4008	2,0489	2,22485	33,35	333503,13	0,33
7c	1,7355	1,7376	1,73655	25,70	256967,08	0,26
9c	0,8482	0,8533	0,85075	11,81	118126,96	0,12
10c	0,8261	0,8439	0,835	11,57	115658,31	0,12
11c	2,0701	1,9958	2,03295	30,34	303424,76	0,30
13c	2,4865	2,5218	2,50415	37,73	377280,56	0,38
14c	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
2e 1	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
2e 30	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
2e 60	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
3e 1	2,0599	1,8876	1,97375	29,41	294145,77	0,29
3e 30	1,8879	1,7358	1,81185	26,88	268769,59	0,27
3e 60	1,7334	1,5626	1,648	24,31	243087,77	0,24
4e 1	1,3499	3,1594	2,25465	33,82	338173,98	0,34
4e 30	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
4e 60	2,9434	2,7988	2,8711	43,48	434796,24	0,43
5e 1	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
5e 30	2,3188	2,2269	2,27285	34,10	341026,65	0,34
5e 60	1,8031	1,8576	1,83035	27,17	271669,28	0,27
6e 1	1,6255	1,5467	1,5861	23,34	233385,58	0,23
6e 30	1,7372	1,707	1,7221	25,47	254702,19	0,25
6e 60	2,1376	2,2414	2,1895	32,80	327962,38	0,33
7e 1	0,7845	0,3994	0,59195	7,76	77562,70	0,08
7e 30	0,6769	4	2,33845	35,13	351308,78	0,35
7e 60	3,0276	2,6072	2,8174	42,64	426379,31	0,43
8e 1	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
8e 30	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
8e 60	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
9e 1	3,1465	2,9739	3,0602	46,44	464435,74	0,46
9e 30	1,6711	1,6049	1,638	24,15	241520,38	0,24
9e 60	1,3141	1,3317	1,3229	19,21	192131,66	0,19
10e 1	3,412	3,1984	3,3052	50,28	502836,99	0,50
10e 30	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
10e 60	4	4	4	61,17	611739,81	0,61
11e 1	2,1657	2,1857	2,1757	32,58	325799,37	0,33
11e 30	2,08	2,0048	2,0424	30,49	304905,96	0,30
11e 60	2,29	2,3513	2,32065	34,85	348518,81	0,35

Reta Calibração

