

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TNF- α EM CÉLULAS CRFK PERANTE A INFECÇÃO POR FCV EM DIFERENTES TEMPOS E MOI

GABRIEL DA SILVA ZANI¹; RENATA NOBRE DA FONSECA²; RENATA PIEROBOM GRESSLER³; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER⁴; MARCELO DE LIMA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – gzani27@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – repierobomgressler@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mdelima.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O calicivírus felino (FCV) é um patógeno altamente contagioso com ampla distribuição e de importância clínica em felinos domésticos, responsável por doenças respiratórias, orais e sistêmicas. Embora seja frequentemente associado a úlceras orais, particularmente na língua e no palato, bem como a sinais leves de infecção respiratória, o FCV pode ser encontrado em portadores assintomáticos, ao mesmo tempo, que a infecção por variantes mais virulentas pode causar síndromes graves como a Doença Sistêmica Virulenta (FCV-VSD). (HOFMANN-LEHMANN et al., 2022)

O FCV é pertencente do gênero *Vesivirus* e da família *Caliciviridae*. Trata-se de um vírus não envelopado de morfologia icosaédrica, com RNA genômico de fita simples de sentido positivo, linear, de aproximadamente 7,5 kb (VINJÉ et al., 2019).

A resposta imune inata desempenha papel fundamental para a defesa contra agentes infecciosos, sendo mediada pela liberação de citocinas, moléculas sinalizadoras cruciais secretadas a nível celular. Alguns tipos de infecção estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que possui múltiplas funções biológicas, como a indução de apoptose, a modulação da resposta imunológica e a proteção celular (KALLIOLIAS; IVASHKIV., 2016). No entanto, ainda há uma lacuna no entendimento da sua dinâmica específica durante a infecção por FCV.

O objetivo do estudo foi avaliar a expressão gênica (mRNA) da citocina inflamatória TNF- α , mediante a infecção com FCV em células de *Crandell-Rees Feline Kidney Cell* (CRFK) utilizando diferentes multiplicidades de infecção viral (MOI) e tempos.

2. METODOLOGIA

Os testes foram conduzidos utilizando placas de 24 poços com cultivos celulares de CRFK, divididas em grupo controle e grupos infectados com FCV em 1, 10⁻¹ (0.1), 10⁻² (0.01), 10⁻³ (0.001) MOI. As placas foram incubadas por 6h e 24h em estufa com 5% CO₂ a 37 °C, mantidas em MEM (Meio Essencial Mínimo) enriquecido com soro fetal bovino (SFB) a 10%. A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen™). A quantificação e avaliação da pureza foram realizadas por espectrofotometria usando o NanoDrop® (Thermo Scientific™), e o RNA foi padronizado para uma concentração de 25 ng/ μ L. A síntese do cDNA foi efetuada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems™), conforme as recomendações do fabricante.

A testagem das amostras foi realizada em duplicata, através do termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) utilizando 2 µL de amostra (50ng), 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega™), 0,1 µL de CxR Reference Dye, 0,25 µL *primer forward* (PF), 0,25 µL *primer reverse* (PR) (10µM/µL) e 2,4 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNase (SIGMA™).

Foram selecionados *primers* felinos (Tabela 1) para detecção do mRNA para GAPDH e β-actina (controles endógenos) e TNF-α. As condições de termociclagem consistiam em etapa inicial de desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A curva de dissociação foi gerada com 95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Para análise da expressão gênica foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os dados foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparações múltiplas, através do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados

Genes	Sequências (5'-3')	Referências
GAPDH	F - CATCAATGGAAAGCCCATCAC R - CCCAGTAGACTCCACAACATAC	KHAIR et al. (2022)
β-actina	F - CTCTCCAGCCTTCCTTCCT R - ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	ALCHLEITNER et al. (2011)
TNF-α	F - CTTCTCGAACTCCGAGTGACAAG R - CCACTGGAGTTGCCCTCA	KIPAR et al. (2006)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após análise da expressão relativa, demonstraram que a infecção de FCV foi capaz de induzir a expressão de TNF-α, alcançando os maiores valores após 24 horas, em 1, 10⁻¹ e 10⁻² MOI, respectivamente (Gráfico 1 e 2). Em seu ponto máximo, 1 MOI em 24h, a indução do mRNA de TNF-α foi 107,9 vezes maior quando comparada as células do grupo controle.

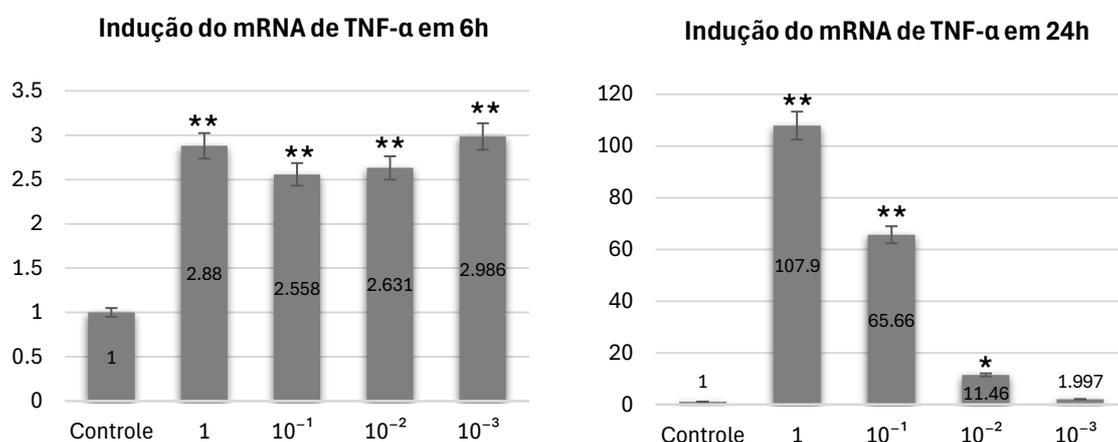


Gráfico 1 e 2. Níveis relativos de mRNA de TNF- α em células CRFK infectadas com FCV em diferentes multiplicidades de infecção (MOI) e tempos de incubação (6h e 24h). A expressão de mRNA de TNF- α foi normalizada em relação às células controle.

Destaca-se que a expressão da citocina TNF- α , alcançou valores médios próximos entre todos as multiplicidades de infecção nas primeiras 6h, entretanto após 24h, os MOIs mais elevados mostraram uma correlação positiva com os níveis de expressão de TNF- α , proporcionando uma notável diferença entre os grupos.

Nossos achados sugerem que a carga viral, e principalmente, o tempo pós infecção são determinantes críticos na modulação da resposta inflamatória. Sekiguchi et al., (2021) também sugere que diferentes níveis de estímulo viral podem influenciar a magnitude da resposta inflamatória, corroborando nossas observações. Entretanto, em mesmo estudo, observou-se que o pico de indução de TNF- α foi alcançado em um MOI de 10^{-2} após 24 horas, seguido por uma diminuição nos níveis de expressão à medida que a carga viral aumentava. Essa redução foi atribuída a efeitos citopáticos do vírus, que resultaram em uma diminuição da viabilidade celular. A divergência entre nossos resultados e os de Sekiguchi et al., (2021) pode ser relacionada às características específicas da cepa viral utilizada em nosso experimento, que pode apresentar diferentes padrões de citopatogenicidade.

Embora seja uma importante citocina associada a resposta imune, a produção exacerbada de TNF- α pode ocasionar o desenvolvimento de quadros deletérios de inflamação excessiva ou crônica, e em níveis sistêmicos levando ao choque endotóxico (KALLIOLIAS; IVASHKIV., 2016). Nesse contexto alguns estudos sugerem que super indução do TNF- α a nível tecidual local e sistêmico pode desempenhar um papel crucial na exacerbação dos sintomas durante a infecção por calicivírus (FOLEY et al., 2006).

Nossa pesquisa, reforça a relevância de investigar as dinâmicas temporais e as concentrações virais para compreender melhor as respostas inflamatórias em infecções virais. Além disso, embora ainda em etapas iniciais, esses processos podem auxiliar no direcionamento de estudos futuros que explorem como o bloqueio dessas citocinas pode atenuar os sintomas clínicos e melhorar o prognóstico de gatos infectados.

4. CONCLUSÕES

A infecção pelo calicivírus felino em células CRFK induziu uma resposta pró-inflamatória significativa, com aumento da expressão de TNF- α . A robustez da resposta, variou entre diferentes tempos e multiplicidades de infecção. Esses resultados fornecem informações importantes para compreensão dos mecanismos de patogênese do FCV, assim como indica possíveis estratégias de combate a infecção viral. Também se estabelece como um estudo de base para utilizações futuras do vírus como potente indutor inflamatório em pesquisas de imuno modulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHLEITNER, A.; CLARK, M. E.; BIENZLE, D. T-regulatory cells infected with feline immunodeficiency virus up-regulate programmed death-1 (PD-1). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3–4, p. 307–313, 15 out. 2011.

FOLEY, J. et al. Virulent systemic feline calicivirus infection: Local cytokine modulation and contribution of viral mutants. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 1, p. 55–61, 1 fev. 2006.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Calicivirus Infection in Cats. **Viruses** 2022, Vol. 14, Page 937, v. 14, n. 5, p. 937, 29 abr. 2022.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49–62, 1 jan. 2016.

KIPAR, A. et al. Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, n. 3–4, p. 305–315, 10 fev. 2001.

KHAIR, M. H. M. M. et al. Expression of Toll-like receptors 3, 7, 9 and cytokines in feline infectious peritonitis virus-infected CRFK cells and feline peripheral monocytes. **Journal of Veterinary Science**, v. 23, n. 2, p. e27, 1 mar. 2022.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SEKIGUCHI, K. et al. Caliciviruses induce mRNA of tumor necrosis factor α via their protease activity. **Virus Research**, v. 306, p. 198595, 1 dez. 2021.

VINJÉ, J. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 11, p. 1469–1470, 2019.