

## **EFEITO DO DIMETILSULFÓXIDO SOBRE A EXPRESSÃO DE TNF- $\alpha$ EM CÉLULAS INFECTADAS COM CALICIVÍRUS FELINO**

**WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA<sup>1</sup>; GABRIEL DA SILVA ZANI<sup>2</sup>; RENATA MARQUES PIEROBOM GRESSLER<sup>3</sup>; FLÁVIA BARTZ NUNES<sup>4</sup>; JOÃO VITOR DE SOUZA GERINGER<sup>5</sup>; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – gzani27@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – repierobomgressler@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – flaviabartznunes8@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – joaogeringer@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – silviaoliveirahubner@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O calicivírus felino (FCV) pertence à família *Caliciviridae*, e possui um genoma formado por uma fita simples de RNA em sentido positivo (ssRNA+) (ICTV, 2025). Apresenta grande importância clínica ao infectar felinos, acarretando doenças respiratórias e orais, e, em casos rares, pode levar a uma forma mais grave e potencialmente fatal chamada FCV-VSD (doença sistêmica virulenta) (WEI et al., 2024).

Danos teciduais mais graves na infecção por FCV podem estar relacionados à produção elevada do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), importante citocina em processos inflamatórios causados por vírus. Nas lesões, é possível identificar níveis aumentados de mRNA de TNF- $\alpha$  em comparação a tecidos de outros animais assintomáticos (SEKIGUCHI et al., 2021).

Devido a importância clínica da elevação do TNF- $\alpha$  relacionada à gravidade das lesões nas infecções por FCV, são visados compostos que inibam a produção da citocina citada. Além de compostos sintéticos, há possibilidade da utilização de moléculas naturais, principalmente voltadas à fitoterapia. No âmbito laboratorial, muitos destes produtos são dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente amplamente utilizado (KARIM et al., 2022).

Levando em consideração a necessidade da pesquisa de novos fármacos que suprimem a produção de TNF- $\alpha$  na patogenia do FCV, assume-se que o DMSO possa figurar como importante componente nos ensaios. Sendo assim, o trabalho propõe-se a identificar possíveis efeitos que o uso de DMSO tenha na expressão de TNF- $\alpha$  em células felinas infectadas por FCV.

### **2. METODOLOGIA**

Os ensaios foram realizados em células CRFK (Crandell-Rees Feline Kidney), linhagem felina disponível no Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O vírus FCV, assim como as células, faz parte do estoque do Labvir. Todos os cultivos foram realizados com MEM (meio essencial mínimo) e soro fetal bovino.

Procedeu-se à titulação viral em cultivo celular de CRFK conforme descrito por REED e MUENCH (1938), com adaptações. Além disso, foi realizada a contagem do número de células presentes em poços de placas para cultivo celular de 24 cavidades, quando havia 100% de conformação e com os dados obtidos anteriormente, foi possível estabelecer a multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 para o ensaio de imunomodulação.

O efeito do DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) sobre a expressão de TNF- $\alpha$  frente à infecção por FCV, foi avaliado em células cultivadas em placas de 24 cavidades. Foram avaliados os seguintes tratamentos: DMSO 0,5%; DMSO 0,5% + FCV; DMSO 0,25%; DMSO 0,25% +FCV; DMSO 0,125%; DMSO 0,125% + FCV; controle celular (CC); e controle de vírus (FCV). Posterior à incubação de 24 horas, o sobrenadante foi despejado e adicionou-se TRIzol (Invitrogen, EUA) sob o tapete celular para extração e purificação de RNA conforme as instruções do fabricante.

Finalizados os processos de extração e purificação, o RNA foi quantificado pelo espectrofotômetro *NanoDrop Lite* (*Thermo Fisher Scientific*) e padronizado para 20 ng/  $\mu$ L. Seguiu-se com a síntese de cDNA com o “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (*Applied Biosystems*), seguindo o protocolo do fabricante.

A quantificação relativa do mRNA de TNF- $\alpha$  foi realizada através de RT-qPCR, aplicando o método  $\Delta\Delta Cq$ . Os primers de TNF- $\alpha$ , bem como as condições de termociclagem, foram baseados no trabalho de FOLEY e colaboradores (2003), com modificações. Adotou-se como *housekeeping genes*  $\beta$ -actina (ACHLEITNER et al., 2011) e GAPDH (KHAIR et al., 2022).

A análise estatística foi executada com o programa *GraphPad Prism 8.0.1*. Submeteu-se a análise de variância *ANOVA one way*, seguida com teste de *Tukey* para comparação das médias, tendo o valor de  $p < 0,05$  considerado como significativo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A quantificação relativa de mRNA (Figura 1) indicou que o tratamento com DMSO pode aumentar a expressão de TNF- $\alpha$  significativamente, em comparação às células infectadas com FCV (grupo FCV). Especificamente, o grupo DMSO 0,125% + FCV demonstrou uma diferença estatística na expressão de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo FCV. Concentrações mais altas (grupos DMSO 0,5% + FCV e DMSO 0,25% + FCV) não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo FCV. Nas concentrações testadas de DMSO (0,5%, 0,25% e 0,125%), sem a presença do FCV, não houve diferença com o controle de células (grupo CC).

O DMSO é utilizado na medicina veterinária, mais amplamente na medicina de equinos, por sua ação antiinflamatória e antioxidante (KELMER et al., 2008). Além disso, estudos em células de sangue humanas e camundongos indicam uma possível redução na produção de citocinas com o uso de DMSO em concentrações de 0,5% a 2% (ELISIA et al., 2016). HUANG et al. (2020), através de uma revisão bibliográfica, descreve que o DMSO a 2% reduz a produção de TNF- $\alpha$ .

Contudo, no presente estudo, a concentração de 0,125% de DMSO, mostrou incremento significativo de mRNA de TNF- $\alpha$  em células CRFK. O aumento da expressão de algumas citocinas devido a exposição a baixas concentrações de DMSO foi anteriormente relatado. Na revisão de HUANG et al. (2020) é descrita elevação de TNF- $\alpha$  em células humanas tratadas com DMSO a 1%. O fato das concentrações de 0,25% e 0,5% serem idênticas estatisticamente ao controle de FCV, demonstra que a resposta (anti ou pró-inflamatória) frente ao DMSO depende de sua concentração.

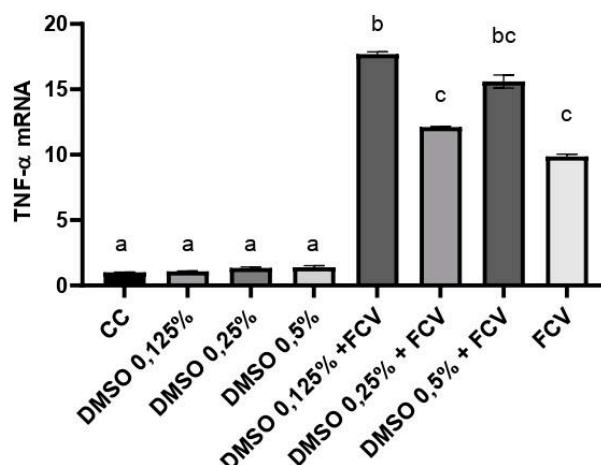


Figura 1. Avaliação da expressão relativa de mRNA de TNF- $\alpha$  com concentrações diferentes de DMSO (0,125; 0,25 e 0,5%) com e sem a presença de FCV. “CC” representa o controle de células. “FCV”, o controle de vírus. Letras iguais acima das barras indicam grupos estatisticamente idênticos e letras diferentes, grupos com diferença estatística ( $p<0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Tratamento com DMSO a 0,125% leva a um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  frente a infecção por FCV em células CRFK. Logo, deve-se considerar possível efeito pró-inflamatório do DMSO em ensaios de imunomodulação que utilize-o como solvente de compostos (naturais ou sintéticos) em células CRFK.

#### 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, out. 2011.

ELISIA, Ingrid *et al.* DMSO Represses Inflammatory Cytokine Production from Human Blood Cells and Reduces Autoimmune Arthritis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152538, 31 mar. 2016.

FOLEY, J.; RAND, C.; LEUTENEGGER, C. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 6, p. 313–322, dez. 2003.

HUANG, S. *et al.* Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. **Immunobiology**, v. 225, n. 3, p. 151906, maio 2020.

ICTV. **Family: Caliciviridae**. 2025. Acesso em 7 de jul. 2025. Disponível em:<https://ictv.global/report/chapter/caliciviridae/caliciviridae/vesivirus>

KARIM, M. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. **Archives of Dermatological Research**, v. 315, n. 6, p. 1465–1472, 2 dez. 2022.

KELMER, G. et al. Evaluation of dimethyl sulphoxide effects on initial response to endotoxin in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 4, p. 358–363, jun. 2008.

KHAIR, M.H. 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, 2022.

REED, L.J.; MUENCH, H.. A simple method of estimating fifty per cent endpoints12. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 493-497, maio 1938. Oxford University Press (OUP).

SEKIGUCHI, Ki et al. Caliciviruses induce mRNA of tumor necrosis factor  $\alpha$  via their protease activity. **Virus Research**, v. 306, p. 198595, dez. 2021.

WEI, Y. et al. Update on feline calicivirus: viral evolution, pathogenesis, epidemiology, prevention and control. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2 maio 2024.