



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA**

**MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**LUCÉLIA MARTINS DE ANDRADE**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM FELINOS (*Felis catus*) INFECTADOS E  
NÃO INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1**

**BELÉM**

**2021**

**LUCÉLIA MARTINS DE ANDRADE**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM FELINOS (*Felis catus*) INFECTADOS E  
NÃO INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Mestre.  
**Área de concentração:** Produção animal  
**Orientador:** Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho.  
**Coorientador:** Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb.

**BELÉM**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP)Bibliotecas da Universidade Federal Rural da  
Amazônia

Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A553e Andrade, Lucélia Martins de  
Expressão gênica de citocinas em felinos (*Felis catus*) infectados e não infectados pelo  
herpesvírusfelino tipo 1 / Lucélia Martins de Andrade. - 2021.  
30 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Saúde e Produção Animal na  
AMAZÔNIA(PPGSPAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da  
Amazônia,Belém, 2021.  
Orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb  
.
1. Medicina Veterinária. 2. Genética. 3. Gatos domésticos. 4. Citocinas. I. da Silva Filho,  
Ednaldo ,  
*orient.* II. Título
-

**LUCÉLIA MARTINS DE ANDRADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 24 de Março de 2021.

**BANCA EXAMINADORA:**

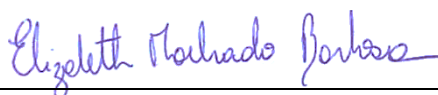


---

Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho - Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

---

Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb - Coorientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA



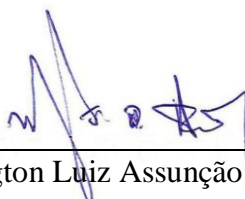
---

Prof. Dra. Elizabeth Machado Barbosa - 1º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP



---

Prof. Dra. Délia Cristina Figueira Aguiar - 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA



---

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira - 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy - SUPLENTE  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Dedico ao meu querido pai, Edmilson Cardoso de Andrade que foi fundamental para a minha formação profissional (*in memoriam*).

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ser minha fortaleza e meu porto seguro e pela grande oportunidade que me concedeu, por meio do mestrado.

A minha família, em especial a minha mãe Lúcia, por ser minha maior incentivadora, por todas as suas orações e pelos conselhos durante o mestrado. Aos meus irmãos João Lucas e Jefferson, por toda a ajuda e carinho.

Aos meu orientador, Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho, pela confiança depositada a mim, pela troca de conhecimentos, pelos esclarecimentos e ensinamentos repassados durante esses 2 anos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb, por toda ajuda e por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Aos membros da comissão examinadora da presente dissertação: Prof. Dra. Délia Aguiar, Prof. Dra. Elizabeth Barbosa, Prof. Dr. Igor Hamoy e Prof. Dr. Washington Pereira, por todas as correções e sugestões que fizeram, e por terem aceitado o convite de imediato. A participação de vocês foi de fundamental importância para tornar este trabalho mais completo. Muito obrigada.

A CAPES, pelo auxílio financeiro concedido por meio da bolsa de mestrado.

A minha amiga Elem Cristina, por toda a ajuda no laboratório durante o experimento, por sua amizade, desde o período da graduação. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos, Gabriel Sampaio, Carol Melo, Yan Cruz e Roberta Souza por toda a ajuda durante as coletas, pela amizade e carinho.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa dissertação, meu muito obrigada!

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia, e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Teixeira de Andrade.

## RESUMO

*Objetivos* Os objetivos deste estudo foram investigar a prevalência do Herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1) em gatos domésticos e associar as expressões gênicas das citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  em animais positivos e negativos a este vírus. *Métodos* O estudo foi realizado com gatos domésticos atendidos em clínicas e abrigos da região Metropolitana de Belém. Amostras de swabs conjuntivais foram coletadas nesses animais e submetidas à extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), essas amostras foram avaliadas usando a técnica de PCR convencional, a fim de identificar a infecção por FeHV-1. Amostras de sangue também foram coletadas e submetidas à extração do ácido ribonucleico (RNA) para avaliação da expressão gênica das citocinas que foi feita pela técnica de RT-PCR. O gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como gene endógeno. A expressão de cada gene foi determinada pelo método  $2^{-\Delta C_t}$ . Os perfis de expressões gênicas foram testados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. E o teste t de Student foi aplicado para diferenciar os níveis de expressões dessas citocinas entre animais positivos e negativos ao FeHV-1 através do programa SAS (Free Version University Edition). O nível de significância foi  $p < 0,05$ . *Resultados* Cinquenta e cinco gatos foram incluídos no estudo e nove (16%) gatos foram positivos para a infecção pelo FeHV-1. Os genes TNF- $\alpha$  e a IL-6 demonstraram significância ( $p < 0,05$ ), sendo que o gene TNF- $\alpha$  expressou 2x mais os negativos e o gene IL-6 expressou 2x mais os positivos. As citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$  e IFN-b não apresentaram significância ( $p > 0,05$ ). *Conclusões e relevância* A análise de RT-PCR na avaliação dos perfis de expressão gênica de citocinas em gatos positivos e negativos ao herpesvírus felino pode ser usada para avaliar o estado imunológico, pois sugere o estágio de infecção desses animais.

**Palavras chave:** *Felis catus*, FeVH-1, citocinas, resposta imune.



## ABSTRACT

*Objectives* The objectives of this study were to investigate the prevalence of FeHV-1 in domestic cats and to associate the cytokine gene expressions: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  in positive animals and negative to this virus. *Methods* The study was carried out with domestic cats from veterinary clinics and shelters in the metropolitan region of Belém. Samples of conjunctival swabs were collected in these animals and subjected to deoxyribonucleic acid (DNA) extraction, these samples were evaluated using the conventional PCR technique, the in order to identify FeHV-1 infection. Blood samples were also collected and submitted to ribonucleic acid (RNA) extraction to evaluate the cytokine gene expression that was performed by the RT-PCR technique. The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an endogenous gene. The expression of each gene was determined by the  $2^{-\Delta Ct}$  method. Gene expression profiles were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. And the student t test was applied to differentiate the levels of expression of these cytokines between FeHV-1 positive and negative animals through the SAS program (Free Version University Edition). The level of significance was  $p < 0.05$ . *Results* Forty cats were included in the study and six (15%) cats were positive. The TNF- $\alpha$  and IL-6 genes showed significance ( $p < 0.05$ ), with the TNF- $\alpha$  gene expressing 2x more negatives and the IL-6 gene expressing 2x more positives. *Conclusions and relevance* The analysis of RT-PCR in the evaluation of gene expression profiles of cytokines in cats positive and negative for feline herpesvirus can be used to assess the immune status, as it suggests the stage of infection of these animals.

**Keywords:** *Felis catus*, FeVH-1, cytokines, immune response.

## LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
$\mu\text{L}$	microlitro
mL	mililitros
nm	nanômetro
ng	nanograma
CaHV-1	Herpesvírus canino 1
COMAC	Comissão animais de companhia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático ELISA
FeHV-1	Herpesvírus felino tipo 1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IFA	Anticorpos imunofluorescentes
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IFN- $\omega$	Interferon-ômega
IL1- $\alpha$	Interleucina 1-alfa
IL1- $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina-6
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PhHV	Phocid herpesvírus
RNA	Ácido ribonucleico
SN	Soroneutralização
SAS	Statistical analyse software
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alpha
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral-beta
RANTES	regulado na ativação de células T normais expressas e proteína secretada

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1

<b>1.CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Revisão de literatura .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Etiologia .....	3
1.1.2 Epidemiologia .....	3
1.1.3 Patogenia e ativação viral .....	4
1.1.4 Sinais clínicos .....	4
1.1.5 Diagnóstico .....	5
1.1.6 Citocinas e estimulação de sua produção .....	5
1.1.7 Análise da expressão gênica .....	8
<b>2. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>9</b>

### CAPÍTULO 2

<b>2. EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM FELINOS (<i>Felis catus</i>) INFECTADOS E NÃO INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1 .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Amostras e critérios de inclusão .....	10
2.2.2. Diagnóstico molecular.....	11
2.2.3. Extração do RNA e RT-PCR.....	11
2.2.4. Análise estatística.....	12
<b>2.3 RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
2.3.1 PCR convencional .....	13
2.3.2 Expressão gênica das citocinas .....	13
<b>2.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>17</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

As mudanças nos núcleos familiares geraram a família multiespécie que é caracterizada por pessoas que reconhecem seus animais de estimação como membros da família (CARRÃO, 2017). Segundo Tatibana e Costa-Val (2009) esta mudança na relação homem e animal é atribuída ao fato de que os cães e gatos estão assumindo, cada vez mais, grande importância na manutenção da saúde física e mental das pessoas, além disso, a mudança na interação humano-animal tem gerado um aumento do fenômeno de antropomorfismo que é definido por Serpell (2003) como uma atitude de conceder estado mental humano, envolvendo pensamentos, motivações, sentimentos e crenças a animais.

Dentro desse contexto, a preocupação dos tutores com a saúde dos gatos é frequente, como pode ser observada na pesquisa feita pela Comissão de animais de companhia, do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal (Sindan), que no ano de 2019 ouviu mais de 3.500 pessoas e identificou que 96% dos tutores de gatos consideram a saúde do animal tão importante quanto a de um membro da família (COMAC, 2021). Dessa forma, a necessidade de novas técnicas para a prevenção e diagnóstico, assim como tratamentos de doenças são cada vez mais procuradas na medicina veterinária para melhorar a qualidade de vida dos animais (ARAÚJO et al., 2010).

Nesse sentido, estudos sobre doenças em gatos domésticos são primordiais, especialmente em relação a doenças infecciosas. Um exemplo de enfermidade infecciosa observada com muita frequência nesta espécie animal é a rinotraqueíte viral felina, causada pelo herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1). Estudos sorológicos apontam que o vírus possui ampla distribuição na população felina em todo o mundo, com registro de taxas de exposição de até 97%. A morbidade chega a 100% em populações grandes e em gatos jovens e a mortalidade pode atingir 50% quando associada à infecção generalizada em gatos predispostos (GOULD, 2011; HENZEL; LOVATO; WEIBLEN, 2015).

Diante da infecção causada pelo FeHV-1 o sistema imunológico dos gatos domésticos responde secretando citocinas que são proteínas produzidas por diversas células do sistema imunológico como: monócitos, neutrófilos, macrófagos e, principalmente, linfócitos T. Pelo fato da maioria das citocinas possuírem alta atividade biológica a concentração homeostática nos fluidos corporais é baixa, em indivíduos saudáveis, porém, diante de estímulos inflamatórios e agentes infecciosos sua

concentração pode aumentar até 1.000 vezes (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015; TIZARD, 2015).

As citocinas podem ser usadas como biomarcadores também chamados de marcadores biológicos que são elementos celulares, estruturais e bioquímicos usados para determinar alterações celulares e moleculares em células e tecidos normais ou lesionados. Esses marcadores são utilizados para o diagnóstico e estimativa da eficiência de tratamentos por meio de métodos moleculares, bioquímicos, imunológicos, entre outros, nos mais diversos fluidos corporais e tecidos (OLIVEIRA; NUNES-PINHEIRO, 2013).

Sendo assim, o objetivo deste estudo é identificar gatos domésticos infectados ou não com o FeHV-1 por meio de amostras de conjuntivas colhidas com auxílio de swabs, e avaliar o perfil da expressão gênica de citocinas nestes gatos, para que a partir dos dados obtidos, seja possível identificar diferentes fatores que alterem a secreção das citocinas e obter uma melhor compreensão sobre a participação destas na infecção viral.

## **1.1 Revisão de literatura**

### **1.1.1 Etiologia**

O Herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1) pertence à Ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varricellovirus* (ICTV, 2020). Esse vírus foi isolado pela primeira vez no ano de 1957, em Washington, EUA, em amostras teciduais de gatos como o agente causador da rinotraqueíte viral felina (CRANDELL; MAURER, 1958).

O tamanho do vírion de FeHV-1 oscila de 120 a 180nm. Ele é constituído de um núcleo que contém uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla linear; um capsídeo icosaédrico ao redor do núcleo, uma camada proteica amorfa, chamada de tegumento ao redor do capsídeo e um envelope de bicamada lipídica com pontas de glicoproteínas na sua superfície. O envelope lipoproteico confere fragilidade ao vírus fazendo com que álcoois e detergentes o inativem. A infectividade é perdida após o contato com isopropanol ou etanol a 70-80% por cinco minutos, pelo formaldeído a 0,2-0,8% e/ou glutaraldeído a 2%. Além disso, ocorre a inativação, após o contato por 10 minutos, com substâncias de pH abaixo de 3 e acima de 11 (FRANCO; ROEHE, 2007).

Todos os isolados de FeHV-1 pertencem antigenicamente a um único sorotipo e na análise de enzimas de restrição de seu DNA eles se manifestam de forma homogênea.

Os herpesvírus relacionados geneticamente ao FeHV-1 são: herpesvírus canino 1 (CaHV-1) e phocid herpesvírus (PhHV) 1 e 2 (THIRY et al., 2009).

#### 1.1.2 Transmissão, patogenia e reativação viral

O FeHV-1 apresenta distribuição mundial e infecta principalmente gatos domésticos, embora o vírus tenha sido isolado de leões e guepardos e anticorpos já tenham sido detectados em pumas. Em humanos não há relatos de transmissão (THIRY et al., 2009). Não há predisposição por idade, sexo ou raça (GASKELL et al., 2007). Após o contato com o vírus mais de 80% dos animais permanecem infectados de forma latente, com 45% desses gatos eliminando o vírus de forma espontânea ou como resultado de situações de estresse natural (GOULD, 2011).

O vírus é eliminado nas secreções nasais, oculares e orais e pode ser transmitido de forma direta após o contato do animal saudável com essas secreções. Gatos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem a infecção latente e podem eliminar o vírus e infectar animais suscetíveis. A transmissão indireta por meio de fômites contaminados, apesar de ser pouco frequente pode ocorrer, na maioria das vezes em abrigos, devido à aglomeração de animais. Acredita-se que os aerossóis têm reduzida participação na disseminação do vírus, pois os gatos não produzem um aerossol infeccioso durante a respiração normal. Não há conhecimento de reservatório não felino e hospedeiro alternativo (FRANCO; ROEHE, 2007; GASKELL et al., 2007).

A infecção pelo FeHV-1, na maioria dos gatos domésticos ocorre pelas mucosas nasal, oral e conjuntiva em animais jovens e imunologicamente deprimidos. Nas células epiteliais dessas membranas, principalmente na conjuntiva, ocorre a rápida replicação do vírus que logo em seguida, ascende pelos axônios dos neurônios sensoriais para o gânglio trigeminal, local em que permanece durante toda a vida do animal, processo chamado de latência (MAGGS, 2005).

A reativação viral pode ocorrer devido a fatores estressantes como a administração sistêmica de corticosteroides, cirurgias, coinfeção com outros agentes, troca de ambiente, parto e lactação (SILVA et al., 2014). A reativação pode ser assintomática, ou associada à sintomatologia clínica, quando é chamada de recrudescência. O vírus infeccioso é transportado do gânglio trigêmeo para os tecidos periféricos via axonal anterógrada, geralmente para as células que estão próximas ou no próprio local da infecção inicial (MAES, 2012).

#### 1.1.3 Sinais clínicos

As principais alterações clínicas observadas nos animais com rinotraqueíte, em condições naturais e experimentais são: perda de apetite, febre, depressão, anorexia, espirros e hiperemia conjuntival. Secreções nasais e oculares estão presentes e o seu aspecto pode ser seroso, mucopurulento ou serossanguinolento, definidos de acordo com a gravidade da doença e infecção bacteriana secundária. Eventualmente pode ocorrer alteração neurológica como seqüela da infecção, dermatite, úlceras orais e cutâneas, assim como pneumonia primária e infecção generalizada, especialmente em animais jovens ou suscetíveis que pode conduzir ao óbito (GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009).

#### 1.1.4 Diagnóstico

Os sinais clínicos e o histórico podem direcionar para um provável diagnóstico, mas é necessário o diagnóstico específico feito por meio de testes laboratoriais que incluem testes de anticorpos imunofluorescentes (IFA); detecção de anticorpos por soroneutralização (SN) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) e isolamento do vírus (VI) em culturas de células ou métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MAGGS, 2005).

A PCR identifica o FeHV-1 por meio da amplificação do DNA viral em sequências específicas. O gene da timidina quinase altamente conservado é muito utilizado como base para os iniciadores nas reações de PCR. Testes de PCR convencional, nested PCR e PCR em tempo real são utilizados com frequência por laboratórios na identificação do FeHV-1 a partir de swabs conjuntivais, nasais ou orofaríngeos, raspagens de córnea, humor aquoso, sangue ou biópsias. Por ser altamente específica e ter alta sensibilidade a PCR é o método de diagnóstico mais eficaz na identificação do FeHV-1 (THIRY et al., 2009; GOULD, 2011).

#### 1.1.5 Citocinas e a estimulação de sua produção

O sistema imunológico é constituído por várias células e mediadores que interagem em uma rede complexa e ativa para proteger o hospedeiro contra microrganismos estranhos e, ao mesmo tempo, manter a tolerância a antígenos próprios. O sistema imune é dividido em imunidade inata e adaptativa, e estas possuem um importante papel na formação de respostas inflamatórias agudas e crônicas (ABRAHA, 2020).

As principais células envolvidas na imunidade inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK, este tipo de resposta possui

importantes mecanismos como a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, produção de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Em contrapartida, os linfócitos são as principais células envolvidas na imunidade adquirida, que é constituída pela imunidade humoral e celular, responsáveis pela defesa contra microrganismos extracelulares e intracelulares, respectivamente. A especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo são algumas características da resposta adquirida (MARQUESI; REIGOTA; OLIVEIRA-BUENO, 2018).

As citocinas são moléculas de sinalização celular, amplamente utilizadas na comunicação intercelular, e podem ser classificadas como proteínas, peptídeos ou glicoproteínas (ABRAHA, 2020). Outras atividades desempenhadas pelas citocinas são: regular as respostas imunológicas e desenvolvimento hematopoiético, assim como as respostas do hospedeiro diante de agentes infecciosos e estímulos inflamatórios (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

Algumas propriedades como: pleiotropia, redundância, sinergia, antagonismo e indução em cascata, podem ser observadas nas citocinas, e isso concede a elas controle da atividade celular de forma interativa. Ação pleiotrópica se refere a uma determinada citocina que exerce atividades biológicas variadas em diferentes células alvo. A redundância ocorre quando diferentes citocinas possuem efeitos similares. Já o sinergismo acontece quando o efeito associado de duas ou mais citocinas é maior que o efeito individual. O antagonismo acontece quando as citocinas inibem ou compensam os efeitos de outra citocina, e a indução em cascata ocorre quando as ações de uma determinada citocina são responsáveis por estimular a produção de outras citocinas (ABRAHA, 2020).

As citocinas foram divididas nos seguintes grupos: interleucinas, fatores de necrose tumoral, interferons e fatores estimuladores de colônia (TURNER et al., 2014).

O Fator de necrose tumoral (TNF) existe em duas formas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) que apresentam atividades biológicas distintas. O TNF é produzido predominantemente por macrófagos ativadas, entretanto, mastócitos, linfócitos T e B, células NK, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos também podem produzir essa citocina (TURNER et al., 2014).

O TNF participa do desenvolvimento do tecido linfóide, co-estimula a ativação dos linfócitos podendo aumentar a sobrevivência e função destes ou conduzir a morte



celular. Fora do sistema imune, o TNF participa da promoção do desenvolvimento e sobrevivência dos osteoclastos, das células das glândulas mamárias, glândulas sudoríparas e folículos pilosos, além de controlar a atividade neuronal e conduzir respostas inflamatórias em várias células, incluindo células epiteliais e fibroblastos (CROFT; SIEGEL, 2017).

A interleucina- 1 (IL-1) é um importante mediador nas respostas imunológicas ou inflamatórias. Ela atua na ativação de células T, na liberação de linfocinas, como cofator com IL-2 para ativar a proliferação e diferenciação de células B. Além disso, a IL-1 age nas células do estroma da medula óssea para induzir a síntese de fatores estimuladores de colônias, e atua sobre células não linfoides, como mastócitos, fibroblastos, hepatócitos, células neurais e células endoteliais (ABRAHA, 2020).

A família IL-1 possui onze membros, e compreende citocinas pró e anti-inflamatórias. A IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são pró-inflamatórias clássicas, elas são antagonizadas pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). A IL- 18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  e IL-36 $\gamma$  são descritas também como pró-inflamatórias, já a IL-36RA, IL-37 e IL-38 são citocinas anti-inflamatórias (BALLAK et al., 2015). Células epiteliais, fibroblastos, monócitos e linfócitos T produzem IL-1 $\alpha$ . A IL-1 $\beta$  é produzida por monócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas, linfócitos B e células NK (TURNER et al., 2014).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida por variados tipos celulares, incluindo células imunes, adipócitos, células do músculo liso vascular e músculo esquelético. Ela atua regulando a resposta imunológica, inflamação e hematopoiese (LIN et al., 2014) também estimula a produção de neutrófilos através de progenitores da medula óssea, na maioria das vezes atuando junto com fatores estimuladores de colônias, e induz o crescimento de linfócitos B que se diferenciam em produtores de anticorpos (ABRAHA, 2020).

Os Interferons (IFNs) são citocinas que têm papéis importantes na infecção, inflamação, câncer e autoimunidade. Existem 3 tipos de interferons, os do tipo I, II e III. Os IFNs do tipo I incluem os subtipos interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), beta (IFN-  $\beta$ ), epsilon (IFN- $\epsilon$ ), kappa (IFN- $\kappa$ ) e ômega (IFN- $\omega$ ) (MUSKARDIN; NIEWOLD, 2018). O IFN do tipo II possui uma única citocina como representante, o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). E o IFN do tipo III é representado pelo interferon lambda (IFN- $\lambda$ ) e suas subunidades (DUSSURGET; BIERNE; COSSART, 2014).

As células dendríticas plasmocitóides (pdc) são as principais produtoras de IFN- $\alpha$ , enquanto que os fibroblastos, células epiteliais, células dendríticas, fagócitos e

sinoviócitos produzem IFN- $\beta$  (MUSKARDIN; NIEWOLD, 2018). Os IFNs do tipo II são reconhecidos por sua atividade antiviral estimulada por células imunes ativadas, especificamente por células NK e T. Os IFNs do tipo III têm sua distribuição tecidual restrita, e atuam principalmente em superfícies epiteliais (NEGUISHI; TANIGUCHI; YANAI, 2018).

#### 1.1.7 Análise da expressão gênica

A expressão gênica é o procedimento em que a informação contida em um gene é traduzida em estruturas que estão contidas em um tipo celular específico como mRNA ou proteínas. O controle da expressão gênica nos microorganismos é utilizado, sobretudo para permitir que o seu crescimento e divisão sejam potencializados, e no caso dos microorganismos patogênicos, para que a infecção se institua. Dessa forma, a quantificação dos níveis de transcrição de genes específicos pode ser utilizada para tipificar a resposta do estado do hospedeiro (DESROCHE; BELTRAMO; GUZZO, 2005).

A PCR em tempo real (RT-PCR) é apontada como ideal para quantificar a expressão do gene. Ela depende do emprego de corantes fluorescentes para quantificar a transcrição do gene alvo, com o número do ciclo de amplificação em que estes corantes/transcrições são detectados, apresentando uma indicação quanto à abundância relativa ou absoluta das moléculas-alvo (WALKER et al., 2009). Levando em consideração, que tanto as sequências do gene endógeno quanto as sequências do gene de interesse estarão presentes na amostra testada, os dois genes exibirão padrões de variação semelhantes dentro do experimento, exceto em relação ao grau de expressão (EXPÓSITO-RODRÍGUES et al., 2008).

## **2. EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM FELINOS (*Felis catus*) INFECTADOS E NÃO INFECTADOS PELO HERPESVÍRUS FELINO TIPO 1**

### 2.1 Introdução

O herpesvírus felino tipo 1 (FeHV-1) é o agente etiológico da rinotraqueíte viral felina uma doença que é responsável por cerca de metade de todas as infecções respiratórias superiores nasais diagnosticadas em felinos, além de causar lesões oculares nessa espécie (GOULD, 2011). Diferente dos vírus tumorais que possuem oncogenes virais multifuncionais que direcionam a replicação viral e a oncogênese, os herpesvírus

interferem na resposta imune inata do hospedeiro de muitas maneiras diferentes, e essa característica é importante para o estabelecimento da infecção (TIAN et al., 2018).

As citocinas são polipeptídios que atuam na regulação de respostas imunológicas, no desenvolvimento hematopoiético e na comunicação intercelular, além de agir nas respostas do hospedeiro diante de agentes infecciosos e estímulos inflamatórios (LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2001), e suas concentrações elevadas são associadas à inflamação ou progressão da doença (DINARELLO, 2000). Devido a isso, a mensuração das citocinas é importante, pois elas são frequentemente utilizadas como biomarcadores para prever a progressão da doença e acompanhar os efeitos do tratamento (BIENVENU et al., 2000). Mudar por referência mais atual

Alguns estudos em felinos foram conduzidos, utilizando a mensuração de citocinas na avaliação do estado imunológico diante de processos infecciosos, como a investigação conduzida por Foley, Rand e Leutenegger (2003) que avaliaram a transcrição de citocinas em amostras de cérebro de 35 gatos, incluindo gatos com peritonite infecciosa felina (PIF) neurológica, com PIF generalizado, com doença neurológica não diagnosticada como PIF e gatos controle saudáveis. Os autores identificaram aumento da transcrição das citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) em gatos com PIF generalizado.

No estudo de Gelain, Meli e Paltrinieri (2006) foram avaliados os perfis de citocinas em gatos clinicamente saudáveis infectados naturalmente com coronavírus felino, gatos com peritonite infecciosa felina e gatos livres de patógenos específicos, a partir do sangue total desses animais. Este estudo identificou níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  no grupo de animais clinicamente saudáveis que possuíam coronavírus felino em relação aos gatos com peritonite e livres de patógenos.

Para avaliar o perfil da transcrição de citocinas em relação à transcrição do herpesvírus felino, Johnson e Maggs (2005), utilizaram amostras teciduais nasais de gatos adultos e, identificaram, transcrição significativamente maior de IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e RANTES nas amostras em que o mRNA de FeHV-1 foi detectado em comparação as amostras em que o mRNA de FeHV-1 não foi detectável, concluindo que o aumento da transcrição de citocinas/quimiocinas em gatos com mRNA detectável para FeHV-1 sugere um papel do FeHV-1 na inflamação nasal.

Sendo assim, o objetivo deste estudo é diagnosticar o FeHV-1 em gatos domésticos usando a técnica de PCR convencional e associar as expressões gênicas das

citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  em animais positivos e negativos para o FeHV-1.

## 2.2 Material e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) com o número 3284100620. O experimento foi classificado como GI 1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse de acordo com a instrução normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 2.2.1 Amostras

Este estudo foi desenvolvido com amostras de 55 gatos domésticos atendidos em diferentes clínicas veterinárias e abrigos da região Metropolitana de Belém/PA. Os gatos foram incluídos no estudo, após consentimento dos tutores e responsáveis dos abrigos.

A coleta de amostras das secreções oculares por fricção conjuntival para a investigação de FeHV-1 usando PCR convencional foram feitas em cada animal, cada amostra foi armazenada em microtubos com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.

Os gatos também foram submetidos à coleta de sangue por venopunção jugular ou cefálica, após a contenção física. Frascos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram utilizados para a coleta de aproximadamente 1mL de sangue total. Após a coleta e homogeneização esse volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 300  $\mu$ L da solução de estabilização RNAlater<sup>tm</sup>(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após a coleta as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C para os procedimentos laboratoriais de análise de expressão gênica.

### 2.2.2 Diagnóstico molecular

O DNA genômico foi extraído de 55 amostras conjuntivais com auxílio de swabs usando o kit comercial de extração de gDNA da Bio gene (Quibasa, Belo Horizonte, MG, BR) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C para posterior análise. Os primers para amplificação do DNA do FeHV-1 foram desenhados de acordo com as sequências do gene UL23 da Timidina Quinase do vírus. O primer forward (5'- ACTTCCACGAGAACCTCCTG-3') e o primer reverse (5'-

CCGGGCTTTGAAAACACTGA- 3') amplificam um fragmento alvo de 316 pares de bases.

A reação para o diagnóstico do FeHV-1 foi feita a um volume final de 20 µL contendo 1x de Taq Pol Master Mix 2x (Cellco), 2 µL de DNA extraído (aproximadamente 50ng/ µL) e 5 mmol/µL de cada primer. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído da vacina comercial Felocell® CVR-C (Laboratórios Zoetis Ltda) e como controle negativo foi utilizada água ultra-pura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), obedecendo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 35 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridização a 57.4°C por 30 segundos e temperatura de extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

### 2.2.3 Extração do RNA e RT-PCR

A extração do RNA foi feita em 12 amostras, sendo seis animais positivos e seis negativos para o FeHV-1, a partir de 300 µL de sangue utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e processado de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os RNAs foram quantificados em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) para medir a concentração de RNA. A pureza do RNA foi determinada pelas razões A260/A280 e A260/A230. Todas as amostras de RNA foram diluídas até a concentração de 20ng para a realização da RT-PCR.

As reações de RT-PCR foram feitas para determinar as expressões gênicas dos seguintes genes: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  e o gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que foi utilizado como gene endógeno. As reações foram realizadas com o kit Power Sybr® Green RNA-to-CT one-step (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, com um volume final de 20 µL. Todas as reações foram efetuadas utilizando o CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As sequências com os primers para RT-PCR foram desenhadas pelo software online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) e estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1** - Sequências dos primers das citocinas e do gene endógeno usados no estudo de expressão.

Citocinas	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	ID	pb
TNF- $\alpha$	GTGGAGCTGACAGACAACCA	AGCACATGTGTGGAAGGACA	493755	104
IL-6	CAAATGTGAGGACAGCAAGG	TGAACCCAGATTGGAAGCAT	493687	92
IL-1 $\beta$	GACGGTTTTGTGTGTGATGC	TATGAGCCAGACAGCACCAG	768274	89
INF- $\alpha$	AGACTCTCCCTCTACCTGCA	CTGCAAGGCTGTTGACGAAT	493648	102
INF- $\beta$	GGGATGGAATGAGACCACTG	TCCTCCATGATTCCTCCAG	493849	93
INF- $\gamma$	CATTCAAAGGAGCATGGACA	TTGAGGAAGTCATCCCGTTT	493965	87
GAPDH	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	TGGAAGAGTGGGTGTCCTG	493876	108

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa IL-6: Interleucina-6 IL-1 $\beta$ : Interleucina-1-beta INF- $\alpha$ : Interferon-alfa  
 INF- $\beta$ : Interferon-beta INF- $\gamma$ : Interferon-gama GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ID:  
 Identificador único pb: pares de bases.

Os valores de Ct foram obtidos com base na linha de limiar que determina o final da curva exponencial de RT-PCR e as expressões de cada gene foram determinadas pelo método  $2^{-\Delta Ct}$ , onde o  $\Delta Ct$  corresponde à diferença entre o Ct do gene alvo e Ct do gene endógeno.

#### 2.2.4 Análise estatística

Os perfis de expressões gênicas das citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , INF- $\alpha$ , INF- $\beta$  e INF- $\gamma$  foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, o teste t Student foi aplicado para diferenciar os níveis de expressões dessas citocinas entre animais positivos e negativos ao FeHV-1 através do programa SAS (Free Version University Edition). O nível de significância foi  $p < 0,05$ .

### 2.3 Resultados

#### 2.3.1 PCR convencional

Do total de 55 gatos domésticos avaliados, 16% (9 felinos) foram positivos ao FeHV-1 e 83,64% (46 felinos) foram negativos ao vírus. A figura 1 apresenta o resultado dos PCRs de animais negativos e positivos, respectivamente.

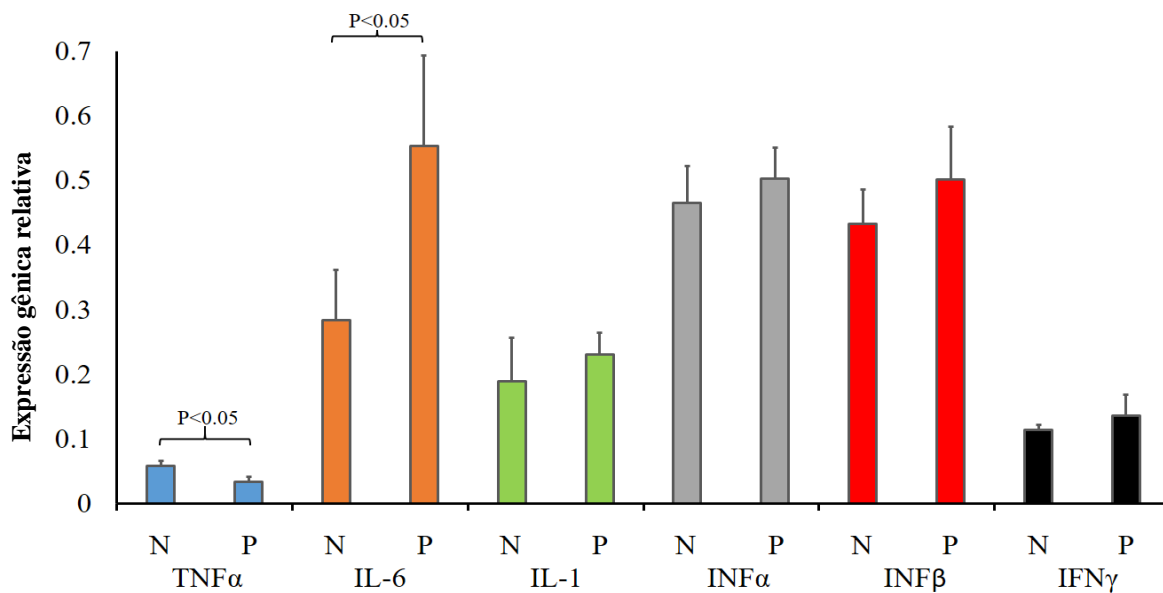


**Figura 1- Resultados das ampliações de FeHV-1 em gatos. As colunas de 1 a 6 representam os animais negativos, as colunas de 7 a 12 representam os animais positivos, seguido da amostra controle positivo, controle negativo e ladder de 100pb.**

**Fonte: própria autora.**

### 2.3.2 Expressão gênica das citocinas

Todas as citocinas foram detectadas e somente as citocinas TNF- $\alpha$  e a IL-6 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de expressão entre animais positivos e negativos ao FeHV-1. A expressão gênica da citocina TNF- $\alpha$  no grupo de animais negativos foi 2 vezes maior do que a observada no grupo de animais positivos. Diferente da expressão gênica da citocina IL-6 que foi 2 vezes maior no grupo de animais positivos comparado ao grupo de animais negativos. Todas as demais citocinas apresentaram aumento de expressão no grupo de animais positivos comparado ao grupo negativo, porém este aumento não foi considerado significativo estatisticamente ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2 – Níveis de expressão relativa dos genes TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1  $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  no sangue de gatos domésticos negativos e positivos ao FeHV-1. P <0.05: diferença significativa observada no gene entre os dois grupos.**

**Fonte: própria autora.**

#### 2.4 Discussão

No presente estudo, a PCR foi utilizada como método de diagnóstico para identificar a presença do FeHV-1 em gatos com e sem sinais clínicos desta infecção, e a prevalência foi de 15% (6/40). Entretanto, no estudo desenvolvido por Low et al. (2007) no Colorado (EUA) em que a PCR foi utilizada como técnica de diagnóstico para detectar esse vírus, em três grupos: gatos sem sinais clínicos, com histórico de conjuntivite e com conjuntivite ativa, a prevalência detectada foi de 6,7% (8/120), prevalência inferior a observada em nosso estudo.

Na Espanha Fernandez et al. (2016) realizaram mesmo teste de diagnóstico e verificaram prevalência de 15,1% (54/358) em gatos com e sem sinais clínicos de doença respiratória, corroborando com a prevalência identificada em nosso estudo. Esses mesmos autores citam que variações na prevalência são relacionadas à técnica empregada no diagnóstico, e a população de gatos estudada.

A IL-6 atua nas reações de fase aguda, respostas imunológicas, hematopoiese e transmissão de sinais de defesa diante de uma invasão de patógenos ou danos teciduais (NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018). Estudos em camundongos direcionados a genes demonstraram a importância da IL-6 para reprimir a resposta inflamatória local e



sistêmica aguda após exposição à endotoxina, além de participar na redução da suscetibilidade a infecções bacterianas, virais e fúngicas (SMITH; MAIZELS, 2014), detectamos expressão significativamente aumentada de IL-6 nas amostras de gatos infectados com FeHV-1, que pode nos indicar que esses animais apresentavam infecção viral recente, pois esta é uma citocina que atua na fase aguda da resposta inflamatória e infecciosa. Alguns autores como Foley; Rand e Leutenegger (2003) e Johnson e Maggs (2005) também demonstraram que o gene da citocina IL-6 é transcrito diante de processos infecciosos em gatos domésticos.

Johnson e Maggs (2005) desenvolveram um estudo com amostras teciduais nasais de 21 gatos adultos de abrigo, e a partir dessas amostras avaliaram a detecção de DNA de FeHV-1 por cultura de células e PCR tradicional, e mRNA das citocinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-16, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e regulado na ativação de células T normais expressas e proteína secretada (RANTES), além do mRNA do FeHV-1 por TaqMan PCR quantitativa em tempo real. Os autores identificaram que nas amostras nasais de gatos em que o mRNA de FHV-1 foi detectado, a transcrição foi significativamente maior de IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e RANTES em relação àquelas amostras em que o mRNA de FHV-1 não foi detectável. Embora esses autores não tenham utilizado sangue total para avaliar a transcrição das citocinas, os valores que eles encontraram corroboram com os valores observados em nosso estudo, em relação a expressão da IL-6 que foi significativa ( $p < 0,05$ ) e 2x maior no grupo de animais positivos ao FeHV-1 em comparação ao grupo negativo. Porém, identificamos uma expressão maior de TNF- $\alpha$  no grupo de animais negativos ao FeHV-1 em relação ao grupo positivo, discordando dos achados de Johnson e Maggs (2005).

Foley; Rand e Leutenegger (2003) conduziram um estudo com amostras de cérebro de 35 gatos, incluindo gatos com peritonite infecciosa neurológica; gatos com PIF generalizado; gatos com doença neurológica não diagnosticada como PIF e gatos controle saudáveis, todas essas amostras foram submetidas a análise histopatológica, a teste de diagnóstico para detectar o coronavírus felino, através de sorologia que foi realizada por ensaio de imunofluorescência direta (IFA) e a TaqMan RT-PCR para avaliar a transcrição do cDNA do coronavírus e mRNA das citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-18, IL-12<sub>p40</sub>, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$  e RANTES, os autores identificaram que gatos com PIF generalizado apresentaram aumento da transcrição das seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e RANTES, embora esses autores tenham utilizado material biológico diferente do que

utilizamos em nosso estudo, os valores encontrados corroboram com a expressão gênica significativa da IL-6 no grupo positivo ao FeHV-1 que encontramos, sugerindo a atuação da IL-6 em infecções virais entéricas e respiratórias. A citocina TNF- $\alpha$  em nosso estudo apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em animais negativos ao FeHV-1, discordando dos achados de Foley; Rand e Leutenegger (2003).

Os perfis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12<sub>p40</sub>, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em gatos clinicamente saudáveis infectados naturalmente com coronavírus felino, gatos com peritonite infecciosa felina e gatos livres de patógenos específicos, foram avaliados em um estudo conduzido por Gelain; Meli e Paltrinieri (2006), a partir do sangue total desses animais, em que foi identificado níveis significativamente mais elevados de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  no grupo de animais clinicamente saudáveis que possuíam coronavírus felino comparado aos gatos com peritonite e livres de patógenos. Em nosso estudo a produção de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  apresentaram aumento de expressão no grupo de animais positivos comparado ao grupo negativo, porém este aumento não foi considerado significativo estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Neste estudo observamos aumento da produção de TNF- $\alpha$  no grupo de gatos negativos ao FeHV-1, e como a presença de lipopolissacarídeos, componentes da membrana de bactérias gram-negativas é o principal estímulo para a produção do TNF- $\alpha$  (TONET; NÓBREGA, 2008), nossa hipótese é de que os animais negativos ao FEHV-1 poderiam estar com uma infecção bacteriana que estimulou o aumento de síntese dessa citocina.

## 2.5 CONCLUSÃO

A análise de RT-PCR na avaliação dos perfis de expressão gênica de citocinas em gatos positivos e negativos ao herpesvírus felino pode ser usada para avaliar o estado imunológico, pois indica se existe infecção aguda e/ou crônica.

## 3. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5 edição. Philadelphia: Saunders. 562 p, 2003.
- ARAÚJO, R. F.; RÊGO, E. W.; LIMA, E. R.; COELHO, M. C. O. C.; VASCONCELOS, K. F.; BAPTISTA, R. I. A. A.; NASCIMENTO, R. C. Terapia floral em gatos domésticos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) portadores do complexo da doença respiratória felina -

estudo clínico e hematológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 472-481. 2010.

BALLAK, D. V.; STIENSTRA, R.; TACK, C. J.; DINARELLO, C. A.; DIEPEN, J. A. V. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Citokyne**, v. 75, p. 280-290. 2015.

BIENVENU, J.; MONNERET, G.; FABIEN, N.; REVILLARD, J. P. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 38, p.267-285. 2000.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. TARGETING IL-1 IN INFLAMMATORY DISEASE: NEW OPPORTUNITIES FOR THERAPEUTIC INTERVENTION. **Nature reviews drug discovery**, v. 3, p. 330-340. 2004.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149-160. 2008.

CARRÃO, M. S. A. **Família multiespécie: a guarda de animais de estimação nos casos de dissolução litigiosa da sociedade e vínculo conjugal**. Monografia (Bacharelado em Direito) - Faculdade de Ciências Jurídicas e Sociais, Universidade de Brasília. Brasília, p. 72. 2017.

Comissão animais de companhia (COMAC). **Mais de 95% dos brasileiros consideram a saúde do pet tão importante quanto a da família**. 30 de julho de 2020. Disponível em < <https://www.comacvet.org.br/2020/07/30/mais-de-95-dos-brasileiros-consideram-a-saude-do-pet-tao-importante-quanto-a-da-familia/> >, acesso em 06 de jan. de 2021.

CRANDELL, R. A.; MAURER, F. D. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion 480 bodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 97, n. 3, p. 487-490. 1958.

CROFT, M.; SIEGEL, R.M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, p. 217-233. 2017.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-61. 2010.

DESROCHE, N.; BELTRAMO, C.; GUZZO, J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 325-333. 2005.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest Journal**, v. 118, p. 503-508. 2000.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; Sham, L.; REIM, E. K.; LANCTÔT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 446-57. 2010.

DUSSURGET, O.; BIERNE, H.; COSSART, P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 50. 2014.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v. 8. 2008.

FERNANDEZ, M.; MANZANILLA, E. G.; LLORET, A.; LEÓN, M.; THIBAUT, J. C. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydia 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**, v. 19, p. 461-469. 2016.

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

FRANCO, A. P.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária**. 1ª edição. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. cap. 17.

GARDAM, M. A.; KEYSTONE, E. C.; MENZIES, R.; MANNERS, S.; SKAMENE, E.; LONG, R. VIN, D. C. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 148-155, 2003.

GASKELL, R.; DAWSON, S.; RADFORD, A.; THIRY, E. Feline herpesvirus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 337-354, 2007.

GELAIN, M. E.; MELI, M.; PALTRINIERI, S. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 389-399, 2006.

GOULD, D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 5, p. 333-346, 2011.

HENZEL, A.; LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R. Epidemiological status of felid herpesvirus type-1 and feline calicivirus infections in Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1042-1049, 2015.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2018b Release. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)>, Acesso em 04 de fev. de 2020.

JANEWAY, C. A.; WAKPORT, P. T. M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5th edition. Yale University School of Medicine. London. 2001.

JOHNSON, L. R.; MAGGS, D. J. Feline herpesvirus type-1 transcription is associated with increased nasal cytokine gene transcription in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3-4, p. 225-233, 2005.

KHOA, N. D.; MONTESINOS, M. C.; REISS, A. B.; DELANO, D.; AWADALLAH, N.; CRONSTEIN, B. N. Inflammatory Cytokines Regulate Function and Expression of Adenosine A2A Receptors in Human Monocytic. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 7, p. 4026-4032. 2001.

KOVARIK, P.; SAUER, I.; SCHALJO, B. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons. **Immunobiology**, v. 212, p. 895–901. 2008.

LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. Macrophage-Neutrophil Interaction: Paradigm for Chronic Inflammation Revisited. **Immunology and Cell Biology**. v. 79, p. 502-506, 2001.

LOW, H. C.; POWELL, C. C.; VEIR, J. K.; HAWLEY, J. R.; LAPPIN, M.R. Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp. DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. **American Journal Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 643-648. 2007.

MAES, R. Review Article: Felid Herpesvirus Type 1 Infection in Cats: A Natural Host Model for Alphaherpesvirus Pathogenesis. **International Scholarly Research Network (ISRN) Veterinary Science**, v. 2012, p.1-14. 2012.

MAGGS, D. J. Update on pathogenesis, diagnosis and treatment of feline herpesvirus type 1. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.20, n.2, p.94-101. 2005.

MARQUESI, K. F.; REIGOTA, K. C. F. R.; OLIVEIRA-BUENO, A. P. Resposta immune e quimiocinas: breve revisão da literatura. **Revista Científica**, v. 1, n. 1. 2018.

MUSKARDIN, T. L. W.; NIEWOLD, T. B. Type I interferon in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, p. 214-228. 2018.

NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19. 2018.

NEGISHI, H.; TANIGUCHI, T.; YANAI, H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v, 1, n 10. 2018.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n.2, p.255-265. 2011.

OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imune-inflamatória modulada por ácidos graxos insaturados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n. 2, p.113-124. 2013.

SANTARLASCI, V.; COSMI, L.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; ANNUNZIATO, F. IL-1 and T helper immune responses. **Frontiers Immunology**, v. 4. 2014.

SCHRODER, K; HERTZOG, P. J; RAVASI, T; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 75, p. 163-189, 2004.

SERPELL, J. A. Anthropomorphism and Anthropomorphic Selection - Beyond the “Cute Response”. **Society and Animals**, v. 10, p. 437- 454. 2003.

SILVA, D. S.; CASTRO, C. C.; SILVA, F. S.; LORENZINI, F.; CORDEIRO, J. M. C.; VARGAS, G. D’A.; FISCHER, G.; LIMA, M.; HÜBNER, S. O. Perspectivas terapêuticas no tratamento das infecções pelo herpesvírus felino tipo 1. **Revista Clínica Veterinária**, v.19, p. 36-44. 2014.

SMITH, K. A.; MAIZELS, R.M. IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 44, p. 150-161. 2014.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J. Bioanalytical Chemistry of Cytokines - A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 95-115, 2015.

TATIBANA, L. S.; COSTA-VAL, A. P. Relação homem-animal de companhia e o papel do médico veterinário. **Revista Oficial do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais.** p. 12-18. 2009. Disponível em < <http://www.crmvmg.gov.br/RevistaVZ/Revista03.pdf> >, acesso em 10 de dez. de 2020.

THIRY, E.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; TRUYEN, U.;

HORZINEK, M. C. Feline Herpesvirus Infection. ABCD Guideline on Prevention and Management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p. 547-555., 2009.

TIAN, J.; LIU, Y.; LIU, X.; SUN, X.; ZHANG, J.; QU, L. Feline herpesvirus 1 (FHV-1) US3 block s type I IFN signal 2 pathway by targeting IRF3 dimerization in a 3 kinase-independent manner. **Journal of Virology**, v. 92, 2018.

TIZARD, I. R. Sinalização celular: Citocinas e seus receptores. In:\_\_\_\_\_. **Imunologia Veterinária**. Tradução da 9ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

TONET, A. C.; NÓBREGA, O. T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas: artigo de revisão. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v.11, n.2, p.259-273, 2008.

WALKER, C. G.; MEIER, S.; MITCHELL, M. D.; ROCHE, J. R.; LITTLEJOHN, M. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. **BMC Molecular Biology**, v. 10, 2009.