

EFEITO DA MIRTAZAPINA NA EXPRESSÃO DE TNF- α EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE GATOS

JULIANA MONTIEL NÚÑEZ¹; WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA², GABRIEL DA SILVA ZANI³, FLÁVIA BARTZ NUNES⁴, RENATA PIEROBOM GRESSLER⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – julianamontielnunez@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – silviaoliveirahubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra patógenos e pela regulação dos processos inflamatórios (CÓRDOVA MARTÍNEZ, 1999). Em felinos, características imunológicas distintas de outras espécies, somadas à influência de fatores como o estresse, tornam essencial a investigação dos efeitos de substâncias imunomoduladoras específicas para essa espécie. Sabe-se que a ansiedade gera diversos prejuízos na vida dos gatos e pode ocasionar transtornos comportamentais que muitas vezes envolvem compulsões que podem ser fonte de problemas para o animal e para o tutor (BEAVER, 2003).

A mirtazapina é um antidepressivo amplamente utilizado em medicina veterinária. Em felinos a mirtazapina é utilizada principalmente como estimulante do apetite, além disso, possui potencial para regular estados de humor e reduzir comportamentos associados à ansiedade, estresse, e alterações comportamentais associadas a condições como doença renal crônica e outros problemas de saúde (ALMISHRI, 2019). Embora seus efeitos terapêuticos sejam bem documentados, ainda são escassos os estudos que investigam seus impactos imunomoduladores, especialmente em células do sistema imunológico de gatos.

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da mirtazapina sobre células mononucleares do sangue periférico felino, buscando entender como esse fármaco pode influenciar a resposta imunológica. Para isso, foram analisados parâmetros de viabilidade celular e expressão de citocinas, com ênfase no fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O TNF- α é uma citocina fundamental na regulação do sistema imunológico, desempenhando um papel central nas respostas inflamatória e imunológica (ABBAS, 2012). A análise de sua expressão frente ao uso de mirtazapina permite uma melhor compreensão de como este fármaco interage com o sistema imune de felinos.

2. METODOLOGIA

Mirtazapina: A mirtazapina em sua forma pura foi obtida através de farmácia de manipulação. A solução estoque foi feita com 0,1M de mirtazapina em 1 mL de DMSO. Após o preparo, a solução estoque foi fracionada e armazenada a -20 °C.

Amostras: Foi selecionado um grupo de 6 felinos hígidos, entre 4 e 6 anos de idade, domiciliados, castrados e dentro do escore corporal normal. Todos foram não reagentes para imunodeficiência felina e leucemia viral felina. Foi realizada a coleta de 3 mL de sangue, de cada um, em tubo contendo EDTA para a obtenção das células mononucleares.

Separação e contagem das células mononucleares do sangue: A separação de células mononucleares do sangue periférico foi realizada em gradiente de Ficoll-Hypaque. Foram colocados 3 mL da amostra de sangue diluída 1:2 em meio de cultivo celular, cuidadosamente, sobre 6 mL de Ficoll-Hypaque em um tubo de Falcon 15 mL com fundo cônico. O tubo é, então, centrifugado a 1.600 rpm por 25 minutos. Durante a centrifugação, ocorre a formação de camadas distintas devido às diferentes densidades celulares. As células mais densas (como os glóbulos vermelhos e granulócitos) ficam na parte inferior, enquanto as células mononucleares ficam na interface entre o Ficoll-Hypaque e o plasma sanguíneo, formando uma camada branca ou opaca visível na interface do Ficoll-Hypaque e do plasma. É realizada, então, a etapa de isolamento das células mononucleares, onde essa camada é cuidadosamente coletada utilizando uma pipeta. As células mononucleares coletadas são lavadas para remover resíduos de Ficoll-Hypaque e outros contaminantes. Isso é feito pela adição de um meio de cultura ou PBS. Após, deve-se ressuspender as células em MEM, e uma suspensão celular é submetida a contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal usando de azul de tripan como controle de viabilidade celular.

Ensaio de citotoxicidade: A avaliação da citotoxicidade do fármaco foi analisada nas células após 24h através do método de redução do MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) à formazan. Nenhuma das concentrações avaliadas (100, 50 e 25) apresentaram efeito tóxico sobre as células, sendo assim, a dose estabelecida para a realização do experimento foi de 50 μ M.

Cultivo das células: As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades. Em um grupo foram adicionados 100 μ L da suspensão de células, 100 μ L da solução de mirtazapina e 100 μ L da solução de concanavalina A na concentração de 5 μ g/mL. Em outro grupo foram adicionados apenas 100 μ L da suspensão de células e 100 μ L da solução de concanavalina A na concentração de 5 μ g/mL. As células ficaram em contato com as soluções por 16 horas e após esse período foram coletadas com TRIzol™ Reagent (Invitrogen) e armazenadas a -80 °C até o seu processamento.

Extração do RNA total e síntese do DNA complementar: O RNA total foi extraído a partir das células estocadas em TRIzol™ Reagent, conforme recomendações do fabricante, utilizando clorofórmio (CHCl₃) (SIGMA), isopropanol ((CH₃)₂CHOH) (SIGMA) e etanol (C₂H₆O) 75%. O RNA extraído foi ressuspendido em 20 μ L de água ultrapura livre de DNAase e RNAse. A quantificação da pureza e do material genético foi realizada em espectrofotômetro. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™). As amostras foram estocadas a -20 °C até o uso.

PCR quantitativo (qPCR): As células foram analisadas através de PCR quantitativo para a avaliação da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral-alfa (TNF α). Foi utilizado o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), seguindo recomendações do fabricante. Para amplificação do material genético foi realizada uma etapa de desnaturação inicial por 10 minutos à 95°C, 40 ciclos de 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 60°C e a curva de dissociação com 95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Análise dos dados: As eficiências das qPCR foram calculadas utilizando o software StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystems™). Os dados foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) e logo após, foi realizado o

teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparações múltiplas, através do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As citocinas são mensageiros químicos produzidos pelas células do sistema imunológico e têm um papel central na regulação da resposta imunológica (TIZZARD, 2014). Quando o sistema imunológico é ativado em resposta a uma lesão, infecção ou outra condição, as células imunes podem expressar genes que codificam citocinas anti ou pró-inflamatórias, como o TNF α . (ABBAS, 2012)

A mirtazapina, além de seu uso como antidepressivo e estimulante de apetite em felinos e humanos, tem demonstrado potenciais efeitos anti-inflamatórios e baixa toxicidade em alguns estudos realizados em exemplares murinos. (NORIZADEH TAZEHKAND, 2015.). No presente experimento realizado em células provenientes de felinos, foram encontrados resultados que corroboram com os achados desses estudos.

Indução do mRNA de TNF- α

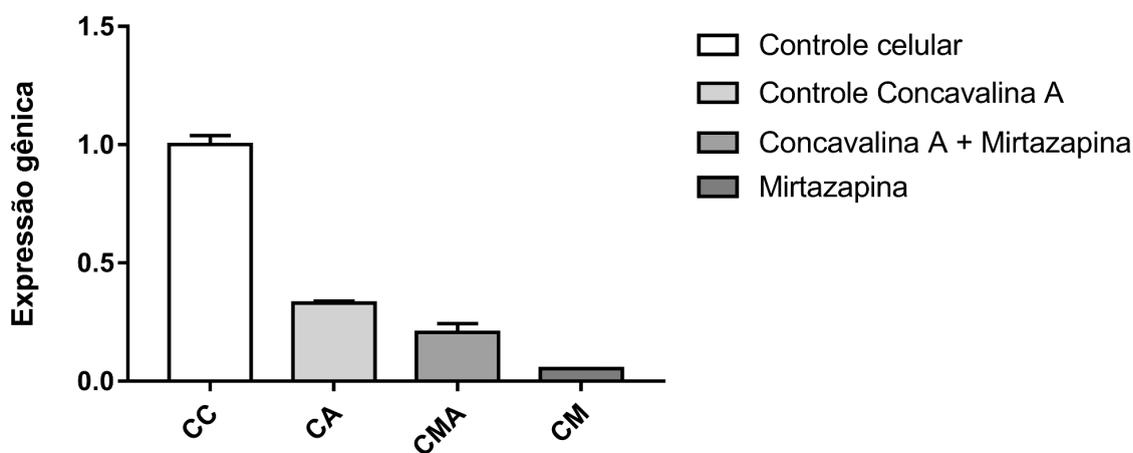


Gráfico da representação da expressão gênica de TNF- α frente os diferentes grupos estudados.

Verificou-se que a mirtazapina pode reduzir a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , que é um importante mediador da inflamação. Essa regulação da resposta inflamatória pode ter um impacto benéfico em condições inflamatórias crônicas. (ALMISHRI, 2019) A realização de mais estudos é necessária para elucidar o mecanismo de ação pelo qual esse fenômeno ocorre.

A realização desse estudo em células primárias apresenta resultados mais próximos do que ocorre *in vivo*, em comparação a estudos nos quais foram utilizadas células de linhagem, já que as células primárias mantêm muitas características fisiológicas do tecido de origem. (FRESHNEY, 2015).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, é possível concluir que a utilização de mirtazapina em células mononucleares do sangue de gatos, resulta em uma redução na transcrição de genes para a citocina pró-inflamatória TNF α . Esses dados sugerem que a mirtazapina pode exercer ação anti-inflamatória para a espécie felina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012

ALMISHRI, Wagdi et al. The antidepressant mirtazapine inhibits hepatic innate immune networks to attenuate immune-mediated liver injury in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 803, 2019.

BEAVER, B. V. et al. **Feline behavior: a guide for veterinarians**. 2. ed. WB Saunders, 2003.

CÓRDOVA MARTÍNEZ, Alfredo; ALVAREZ-MON, Melchor. O sistema imunológico (I): Conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 5, p. 120-125, 1999.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, 2015.

NORIZADEH TAZEHKAND, Mostafa; TOPAKTAS, Mehmet. The in vitro genotoxic and cytotoxic effects of remeron on human peripheral blood lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 266-271, 2015.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. (Tradução da 9ª Edição). 2014.